



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

Instituto Interuniversitario de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM)

**Facultat de Química**

DOCTORADO EN QUÍMICA

# **DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE QUIMIODOSÍMETROS PARA LA DETECCIÓN DE FORMALDEHÍDO**

Presentada por:

**Carlos Martínez Aquino**

Dirigida por:

**Ana María Costero Nieto**

**Pablo Gaviña Costero**

Valencia, Julio de 2020



Ana María Costero Nieto, Catedrática del Departamento de Química Orgánica de la Universitat de València y Pablo Gaviña Costero, Profesor Titular del Departamento de Química Orgánica de la Universitat de València

CERTIFICAN,

Que el trabajo titulado **“Diseño, síntesis y evaluación de quimiodosímetros para la detección de formaldehído”** ha sido desarrollado por Carlos Martínez Aquino bajo su dirección en el Instituto Interuniversitario de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) en la Universitat de València, para optar al grado de Doctor en Química y autorizan la presentación de esta Tesis Doctoral para que se cumplan los trámites reglamentarios.

València, Julio de 2020.

Ana María Costero Nieto

Pablo Gaviña Costero



## Agradecimientos

Arribats a aquest punt, cal tornar enrere i pensar en el camí recorregut. Un camí que va començar a l'any 2014, quan Estefanía em va parlar del grup d'investigació on estava fent pràctiques d'estiu. Em vaig interessar i al cap d'uns dies va començar la meua relació amb el grup d'investigació dirigit per la Prof. Ana M. Costero i integrat per la Prof. Margarita Parra, el Prof. Salvador Gil i el Prof. Pablo Gaviña.

En primer lloc, vull agrair als meus directors Ana M. Costero i Pablo Gaviña per fer possible la realització d'aquesta tesi i ajudar-me en tot el que comporta aquest procés. D'igual manera, vull donar les gràcies als professors Margarita Parra i Salvador Gil per ajudar-me en tot allò que he necessitat i per fer possible diversos dels contractes d'investigació que he tingut, sense els quals aquesta tesi no hauria sigut possible.

En segon lloc, vull agrair l'ajuda de tots els tècnics d'investigació amb els quals he compartit experiments, els quals són de gran ajuda i sense els quals no seria possible aquesta investigació. En especial, he de donar les gràcies al Dr. Luis Aparicio Bellver, professor del departament d'Anatomia i Embriologia Humana de la facultat de Medicina de la UV i als tècnics d'aquest departament per obrir-me les portes del seu lloc de treball i permetre'm dur a terme la meua investigació. D'altra banda agrair també als tècnics de laboratori que m'han ajudat dia a dia (Victor, Ramón, Marga, Ana i Abdul)

Per descomptat, també vull agrair a tots aquells companys i amics amb els quals he compartit aquest procés. A Raúl, Kathe, Almudena i Dani, per ajudar-me a fer els meus primers passos en la investigació i permetre'm formar part de la vostra vida fora del laboratori. També, done les gràcies als companys del lab 4.27 (Elena, Andrea i Alberto) per tota l'ajuda. D'igual manera, a Tania, Silvia i Alejandro per acompanyar-me els últims anys i ajudar-me en tot el possible. Als meus companys de máster, especialment

a Fer, Dan, Ofelia i Dani per totes les bones estones fora del laboratori. Un gran esment també a tots els TFG i TFM que han col·laborat en la realització d'aquesta tesi (Raul, Robin, Shriya i Jonathan).

Finalment, he de donar les gràcies als meus amics per ajudar-me a no perdre la perspectiva i a la meua família per tot l'esforç invertit en la meua educació, sense la qual no hauria arribat fins aquí. Per últim, vull donar-li les gràcies a Estefanía per ajudar-me de totes les maneres en les quals es pot ajudar a una persona, durant un procés que no és fàcil i done gràcies perquè fins i tot hui, estàs aquí.

## Abreviaturas y acrónimos

AuNPs	Nanopartículas de oro
BOC <sub>2</sub> O	Dicarbonato de di-terbutilo
BODIPY	Dipirrometeno de boro
Cys	Cisteína
<i>d</i>	Doblete
DCNP	Dietilcianofosfato
DCM	Diclorometano
<i>dd</i>	Doble doblete
DDQ	2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
DLS	Dispersión dinámica de luz
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDC	N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
em	Emisión
exc	Excitación
FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
FTIR	Espectroscopía infrarroja-transformada de Fourier
GC/MS	Cromatografía de gases/Espectrometría de masas
HOMO	Orbital molecular ocupado de mayor energía
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
ICT	Transferencia interna de carga
LdD	Límite de detección
LUMO	Orbital molecular no ocupado de menor energía
<i>m</i>	Multiplete
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NBS	N-bromosuccinimida
OMS	Organización Mundial de la Salud
PET	Transferencia de carga fotoinducida
ppm	Partes por millón
r.t.	Temperatura ambiente
RGB	Rojo, verde y azul
RMN	Resonancia magnética nuclear
<i>s</i>	Singlete
<i>t</i>	Triplete
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
Tris	Tampón tris(hidroximetil)aminometano
UV-vis	Ultravioleta-visible
$\delta$	Desplazamiento químico
$\Phi$	Rendimiento cuántico



## Resumen

La presente tesis doctoral titulada “Diseño, síntesis y evaluación de quimiodosímetros para la detección de formaldehído” está centrada en el desarrollo de sistemas para la detección cromo-fluorogénica de formaldehído, tanto en disolución acuosa como en fase gas, empleando conceptos de química orgánica, química supramolecular y ciencia de los materiales.

El formaldehído es una molécula ampliamente utilizada en distintos sectores industriales como la industria del mueble, farmacéutica o el sector textil. Sin embargo, su toxicidad pone en riesgo tanto a consumidores como a los trabajadores de dichos sectores, lo que convierte el desarrollo de sensores para detectar y monitorizar los niveles ambientales de formaldehído en un campo de gran interés.

En la introducción se describen los conceptos necesarios para iniciarse en el campo de los sensores y poder comprender el trabajo y los resultados obtenidos. Durante el desarrollo de la tesis se utilizan distintas estrategias para la detección de este analito, desde la síntesis de moléculas orgánicas diseñadas específicamente para reaccionar con formaldehído dando lugar a un cambio de color o de emisión de fluorescencia, hasta el uso de nanopartículas de oro funcionalizadas con distintos ligandos capaces de experimentar procesos de agregación en presencia de formaldehído.

En el capítulo 3 se describe el uso de dopamina y de la reacción de Pictet-Spengler para desarrollar un sistema para la detección de formaldehído en disolución y en fase gas, registrando los cambios observados en los espectros de UV-visible y fluorescencia. Por último, se describe la utilización de dicho sistema en un ambiente real para comprobar su aplicabilidad. Esta experiencia se realizó en la sala de disección de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

En el capítulo 4 se extiende el trabajo realizado en el capítulo anterior funcionalizando en la posición meso un BODIPY con un derivado de dopamina. Tras caracterizar estructural y espectroscópicamente el sistema obtenido, se evalúa su capacidad para la detección de formaldehído en disolución mediante un proceso de transferencia de energía.

En el capítulo 5 se describe la utilización de nanopartículas de oro funcionalizadas con distintos ligandos para la detección cromogénica de formaldehído. Tras caracterizar algunas de las propiedades básicas de estos materiales híbridos, se evalúa su capacidad para agregarse en presencia del analito dando lugar a un cambio de color.

Por último, en el capítulo 6 se describe la síntesis y propiedades de una serie de derivados de BODIPY funcionalizados con un grupo nitrogenado (amina o hidracina) en la posición meso, y se evalúa su capacidad para la detección cromo-fluorogénica de formaldehído tanto en disolución como en fase gas.

## Resum

La present tesi doctoral titulada “Disseny, síntesi i avaluació de quimiodosímetres per a la detecció de formaldehid” està centrada en el desenvolupament de sistemes per a la detecció cromofluorogènica de formaldehid, tant en dissolució aquosa com en fase gas, utilitzant conceptes de química orgànica, química supramolecular i ciència dels materials.

El formaldehid és una molècula àmpliament utilitzada en diferents sectors industrials com la indústria del moble, farmacèutica o el sector tèxtil. No obstant això, la seua toxicitat posa en risc tant consumidors com treballadors d'aquests sectors, la qual cosa converteix el desenvolupament de sensors per a detectar i monitoritzar els nivells ambientals de formaldehid en un camp de gran interès.

A la introducció es descriuen els conceptes necessaris per a iniciar-se en el camp dels sensors i poder comprendre el treball i els resultats obtinguts. Durant el desenvolupament de la tesi s'utilitzen diferents estratègies per a la detecció d'aquest anàlit, des de la síntesi de molècules orgàniques dissenyades específicament per a reaccionar amb formaldehid donant lloc a un canvi de color o d'emissió de fluorescència, fins a l'ús de nanopartícules d'or funcionalitzades amb diferents ligands capaços d'experimentar processos d'agregació en presència de formaldehid.

Al capítol 3 es descriu l'ús de dopamina i de la reacció de Pictet-Spengler per a desenvolupar un sistema per a la detecció de formaldehid en dissolució i en fase gas, registrant els canvis observats en els espectres d'UV-visible i fluorescència. Finalment, es descriu la utilització d'aquest sistema en un ambient real per a comprovar la seua aplicabilitat. Aquesta experiència es va realitzar a la sala de dissecció de la Facultat de Medicina de la Universitat de València.

Al capítol 4 s'estén el treball realitzat al capítol anterior funcionalitzant en la posició meso un BODIPY amb un derivat de dopamina. Després de caracteritzar estructural i espectroscòpicament el sistema obtingut, s'avalua la seua capacitat per a la detecció de formaldehid en dissolució mitjançant un procés de transferència d'energia.

Al capítol 5 es descriu la utilització de nanopartícules d'or funcionalitzades amb diferents ligands per a la detecció cromogènica de formaldehid. Després de caracteritzar algunes de les propietats bàsiques d'aquests materials híbrids, s'avalua la seua capacitat per a agregar-se en presència de l'anàlit donant lloc a un canvi de color.

Finalment, al capítol 6 es descriu la síntesi i propietats d'una sèrie de derivats de BODIPY funcionalitzats amb un grup nitrogenat (amina o hidracina) en la posició meso, i s'avalua la seua capacitat per a la detecció cromo-fluorogènica de formaldehid tant en dissolució com en fase gas.

## Publicaciones

El trabajo realizado en la presente tesis doctoral ha resultado en las siguientes publicaciones:

\* Martínez-Aquino, C.; Costero, A. M.; Gaviña, P.; Gil, S. A new environmentally friendly colorimetric probe for formaldehyde gas detection under real conditions. *Molecules*, **2018**, *23*, 2646-2654.

\* Martínez-Aquino, C.; Costero, A. M.; Gaviña, P.; Gil, S. Resorcinol functionalized gold nanoparticles for formaldehyde colorimetric detection. *Nanomaterials*, **2019**, *9*, 302-311.

\* PATENTE SOLICITADA: Carlos Martínez-Aquino, Pablo Gaviña, Salvador Gil, Ana María Costero. "Procedimiento y Dispositivo para la Detección de Formaldehído." Nº: P201731227; 17 octubre 2017, Universitat de Valencia, España. Nº publicación: ES2710079 A1.



# ÍNDICE

## Capítulo 1. Introducción general

1.1 Química supramolecular	1
1.2 Sensores moleculares	2
1.2.1 Sensores moleculares ópticos	6
1.3 Borodipirrometenos (BODIPYs)	10
1.3.1 Descripción general	10
1.3.2 Síntesis y derivatización	11
1.3.3 Propiedades espectroscópicas	14
1.3.4 Transferencia electrónica fotoinducida	16
1.3.5 Compuestos cassette basados en BODIPYs	19
1.4 Nanopartículas de oro funcionalizadas para aplicaciones en detección	25
1.4.1 Materiales híbridos orgánicos-inorgánicos.	25
1.4.2 Descripción general	26
1.4.3 Métodos de síntesis y funcionalización	28
1.4.3 Aplicaciones en detección	29
1.5 Formaldehído	33

Capítulo 2: Objetivos	41
-----------------------	----

### **Capítulo 3: Dosímetro químico basado en dopamina para la detección de formaldehído**

3.1 Introducción	45
3.2 Resultados y discusión	47
3.3 Conclusiones	61
3.4 Parte experimental	62

### **Capítulo 4. Aproximación al uso de sistemas *cassette* basados en BODIPY para la detección de formaldehído**

4.1 Introducción	69
4.2 Resultados y discusión	73
4.2.1 Preparación y caracterización unidad aceptora basada en BODIPY	74
4.2.2 Preparación de las posibles unidades dadoras y del dosímetro	75
4.2.3 Propiedades ópticas de los sistemas preparados	84
4.3 Conclusiones	93
4.4 Parte experimental	94

### **Capítulo 5. Detección colorimétrica de formaldehído mediante nanopartículas de oro funcionalizadas**

5.1 Introducción	109
5.2 Resultados y discusión	117



5.2.1 Empleo de nanopartículas de oro funcionalizadas con un simulante de guanina y aminos para la detección colorimétrica de formaldehído	117
5.2.2 Empleo de nanopartículas de oro funcionalizadas con un derivado del fenol y aminos para la detección colorimétrica de formaldehído	121
5.2.3 Empleo de nanopartículas de oro funcionalizadas con un derivado del ácido fenilborónico y aminos para la detección colorimétrica de formaldehído	122
5.2.4 Empleo de nanopartículas de oro funcionalizadas con un derivado de resorcinol y aminos para la detección colorimétrica de formaldehído	123
5.3 Conclusiones	138
5.4 Parte experimental	139

## **Capítulo 6: Detección fluorogénica y cromogénica de formaldehído empleando un derivado de BODIPY**

6.1 Introducción	153
6.2 Resultados y discusión	157
6.3 Conclusiones	170
6.4 Parte experimental	171

## **Capítulo 7. Conclusiones**

181

## **Capítulo 8. Bibliografía**

185



# **Capítulo 1. Introducción general**



## 1.1 Química supramolecular

Los estudios de Hermann Emil Fischer<sup>1</sup> sobre las interacciones enzima-sustrato y la introducción por parte de Alfred Werner del concepto de química de la coordinación, llevó a autores como Pedersen<sup>2</sup>, Lehn<sup>3</sup> y Cram<sup>4</sup> a finales del siglo XX a centrar su investigación en el estudio de estructuras macrocíclicas capaces de coordinar iones o pequeñas moléculas neutras, dando lugar a la aparición de un nuevo campo de investigación y acuñando el termino Química Supramolecular. Dicha parte de la química se definió como “la química de los enlaces intermoleculares, cubriendo las estructuras y funciones de las entidades formadas por asociación de dos o más especies químicas”<sup>5</sup>. Por tanto, esta rama de la química se caracteriza por el uso y estudio de interacciones y/o enlaces intermoleculares (enlaces de hidrógeno, interacciones ion-dipolo y dipolo-dipolo, interacciones  $\pi$ - $\pi$  o interacciones hidrofóbicas entre otras), caracterizados principalmente por presentar una energía menor que la observada en los enlaces que mantienen a los átomos unidos dentro de una molécula (enlaces covalentes).

Una de las primeras aplicaciones de la química supramolecular fue la utilización de éteres corona para la complejación selectiva de ciertos iones metálicos<sup>6</sup> y moléculas neutras<sup>7</sup>. La modulación de estas estructuras permitió el diseño específico de receptores moleculares destinados a interaccionar preferentemente con un analito en concreto, dando lugar a procesos de reconocimiento molecular. Finalmente, la incorporación de unidades señalizadoras en estas estructuras, que respondieran ante el proceso de interacción entre el receptor y el analito dio lugar al nacimiento de los llamados sensores moleculares.

## 1.2 Sensores moleculares

Como se ha comentado anteriormente, los sensores moleculares surgieron a raíz de los trabajos realizados en el campo del reconocimiento molecular<sup>8</sup>. Estos sensores moleculares son moléculas o ensamblajes supramoleculares, capaces de interactuar de manera selectiva con un determinado analito, produciendo, como consecuencia de esa interacción, un cambio observable en alguna de sus propiedades físicas macroscópicas (color, emisión de fluorescencia, potencial redox...), de modo que dicho cambio pueda ser cuantificado y utilizado para identificar la presencia y concentración del analito. Podemos identificar dos partes fundamentales en un sensor molecular atendiendo a la función específica que desempeñan en el proceso de detección. Una parte es la encargada de interactuar con el analito (unidad de reconocimiento) y otra parte transduce el cambio generado por la interacción entre receptor y analito en una señal susceptible de ser medida y/o cuantificada (unidad señalizadora)<sup>9</sup>.

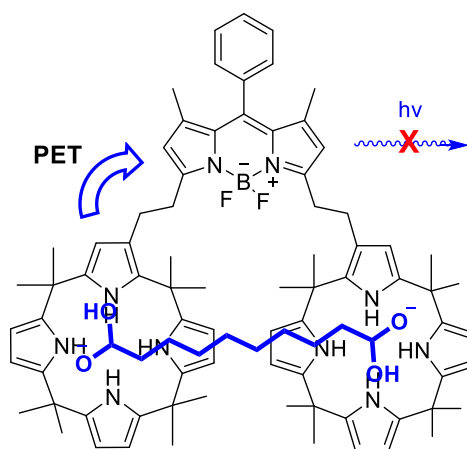
En ciertos sensores moleculares, no es posible establecer una clara separación entre ambas unidades (se hallan íntimamente integradas), aunque de manera general, podemos describir tres grandes aproximaciones al diseño de sensores moleculares, atendiendo a cómo estas unidades están unidas entre sí.

Aproximación unidad receptora-unidad señalizadora: La unidad de reconocimiento se encuentra covalentemente unida a la unidad señalizadora a través de un espaciador (o alternativamente la unidad señalizadora es intrínsecamente complejante). La interacción del analito con el sitio de unión situado en la unidad de reconocimiento produce una variación en la unidad señalizadora del sensor, lo que origina, un cambio en alguna de las propiedades macroscópicas medibles del sensor molecular (figura 1).



**Figura 1.** Representación esquemática del funcionamiento de un sensor molecular diseñado siguiendo la aproximación unidad receptora-unidad señalizadora

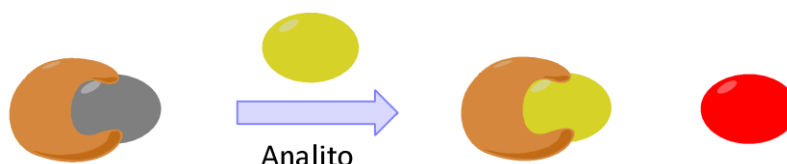
Podemos ilustrar este tipo de aproximación utilizando como ejemplo un sensor molecular desarrollado en nuestro grupo de investigación<sup>10</sup> para la detección de aniones dicarboxilato. El sensor molecular consistió en un derivado del 4-4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (BODIPY, que actuaba como unidad señalizadora) unido covalentemente a través de dobles enlaces a dos unidades de calixpirrol (unidades de reconocimiento). Debido a la estructura del sensor, se producía la coordinación selectiva de ciertos dicarboxilatos, lo que modificaba las propiedades ópticas de la subunidad del BODIPY (figura 2).



**Figura 2.** Ejemplo de sensor molecular basado en la aproximación de unidad receptora-unidad señalizadora. Imagen extraída en el trabajo publicado en “*Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 8, 1515–1520” con permiso de la editorial.

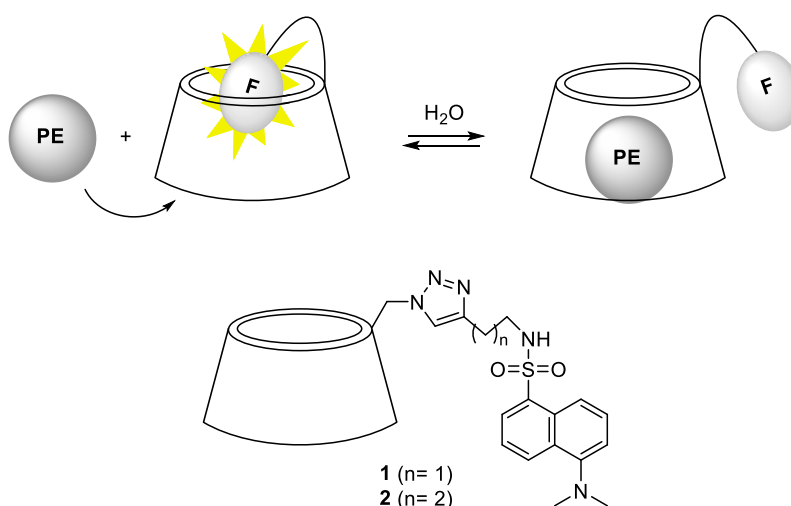
Aproximación del desplazamiento: La unidad de reconocimiento y la unidad señalizadora se encuentran formando un complejo supramolecular, en el que la unidad señalizadora se encuentra inicialmente interaccionando con el sitio de unión de la unidad de reconocimiento. La mayor afinidad del analito por el sitio de unión provoca

el desplazamiento de la unidad señalizadora, que debe exhibir unas propiedades distintas cuando se encuentra libre en disolución a cuando está formando parte del complejo supramolecular. Este hecho permite observar una variación en las propiedades macroscópicas medibles del sensor molecular cuando está presente el analito objeto de estudio (figura 3).



**Figura 3.** Representación esquemática del funcionamiento de un sensor molecular por desplazamiento.

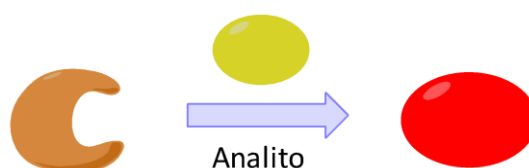
Un ejemplo de sensor molecular por desplazamiento lo encontramos en un trabajo publicado por nuestro grupo de investigación, en el que se utilizó una ciclodextrina como unidad de reconocimiento y un grupo dansilo como unidad señalizadora para llevar a cabo la detección de explosivos peroxídicos<sup>11</sup> (figura 4). Inicialmente la unidad señalizadora se encuentra en el interior de la cavidad de la ciclodextrina. En presencia de los explosivos peroxídicos, éstos desplazan el fluoróforo del interior de la cavidad resultando en una disminución de su fluorescencia.



**Figura 4.** Ejemplo de sensor molecular cuyo funcionamiento es por desplazamiento.

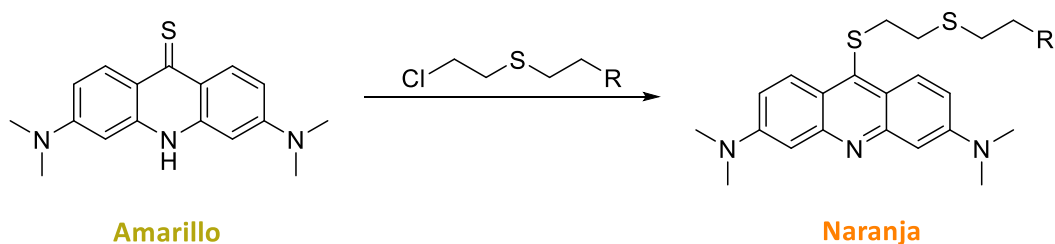


Aproximación del quimiodosímetro: Ambas unidades (reconocimiento y señalización) se encuentran covalentemente unidas y formando parte de la misma molécula. El analito produce una reacción química irreversible con el quimiodosímetro (en este caso no es correcto hablar de sensor molecular), dando lugar a una nueva molécula a través de la formación o rotura de enlaces covalentes. La nueva molécula presenta unas propiedades macroscópicas distintas a las iniciales, poniendo de manifiesto la presencia del analito (figura 5).



**Figura 5.** Representación esquemática del funcionamiento de un quimiodosímetro.

La aproximación del quimiodosímetro ha sido ampliamente utilizada en la bibliografía y para una mejor visualización vamos a mostrar un ejemplo desarrollado por Vinod Kumar<sup>12</sup> et al. en 2018. En él presentan un derivado tiolado de la acridina (no presenta conjugación electrónica) que tras reaccionar irreversiblemente con un derivado del gas mostaza, recupera la conjugación electrónica exhibiendo unas propiedades ópticas distintas a las iniciales (figura 6).



**Figura 6.** Ejemplo de sensor molecular cuyo funcionamiento es de quimiodosímetro. Imagen extraída del trabajo publicado en “*Anal. Chem.* **2018**, 90, 1417-1422” con permiso de la editorial.

Otra de las diferencias que puede usarse para llevar a cabo una clasificación de los sensores moleculares, es el tipo de propiedad macroscópica que se utiliza para identificar la presencia de un analito. Así podemos encontrarnos con sensores

moleculares electroquímicos, ópticos, sensibles a variaciones de masa, magnéticos, térmicos y otros.

### 1.2.1 Sensores moleculares ópticos

De entre todos los tipos de sensores moleculares existentes, uno de los más utilizados es el que emplea fenómenos ópticos, tales como la emisión de fluorescencia o un cambio de color, para señalar el proceso de detección<sup>13</sup>. Estos sensores pueden subdividirse en distintas clases de acuerdo al tipo de propiedad óptica que utilizan como, por ejemplo, los basados en cambios en la longitud de onda y/o intensidad de la absorbancia en el espectro de UV-vis<sup>14</sup>, sensores basados en la aparición o amortiguamiento de la intensidad de fluorescencia<sup>15,16</sup>, reflectancia<sup>17</sup> o dispersión de la luz<sup>18</sup>. Las principales ventajas que aportan los sensores moleculares ópticos son:

- Permiten en muchos casos una detección visual.
- Requieren una instrumentación sencilla y económica en comparación con otros métodos.
- La detección puede llevarse a cabo en tiempo real.
- No se requiere personal especializado.

Los dos tipos de sensores moleculares ópticos más utilizados son aquellos que utilizan cambios en la absorbancia en la región del visible del espectro (cromogénicos) y los que utilizan cambios en la emisión de fluorescencia (fluorogénicos) durante el proceso de detección.

Los sensores cromogénicos, incorporan en su estructura grupos cromóforos, que podemos definirlos como agrupaciones de átomos que son responsables del color en la molécula. El color observado es debido a que dichas agrupaciones poseen electrones capaces de absorber determinadas longitudes de onda de la luz incidente

en la región del visible pasando de un estado fundamental a un estado excitado, reflejando o transmitiendo todas las demás longitudes de onda, las cuales conforman el color que nosotros observamos.

Si el grupo cromóforo se encontraba presente en la molécula antes del proceso de detección del analito, aportando color al sensor, y tras la interacción con el analito desaparece, y por lo tanto también el color de la disolución del sensor estamos ante un caso de sensor molecular óptico “ON-OFF”<sup>19</sup>, denominándose el caso contrario como “OFF-ON”<sup>20</sup>. También es posible que el grupo cromóforo sufra una modificación estructural durante el proceso de detección del analito, por la incorporación o eliminación de un grupo auxocromo (sustituyentes del grupo cromóforo que modifican su longitud de absorción máxima y su coeficiente de extinción molar) dando lugar a desplazamientos batocrómicos (la longitud de absorción máxima del cromóforo se desplaza a mayores longitudes de onda)<sup>21</sup>, hipsocrómicos (la longitud de absorción máxima del cromóforo se desplaza a menores longitudes de onda)<sup>22</sup>, efectos hipercrómicos (se produce un aumento del coeficiente de extinción molar del cromóforo) o efectos hipocrómicos (se produce una disminución del coeficiente de extinción molar del cromóforo).

Por otra parte, los sensores fluorogénicos<sup>23</sup> incorporan en su estructura grupos fluoróforos, que podemos definirlos como agrupaciones de átomos que son responsables de la emisión de fluorescencia en la molécula. De forma general, la luz absorbida por estas moléculas puede ser emitida a través de los dos procesos luminiscentes principales, fluorescencia (emisión desde un estado excitado singlete) y fosforescencia (emisión desde un estado excitado triplete). Estos procesos pueden visualizarse fácilmente a través del diagrama de Jablonski (figura 7).

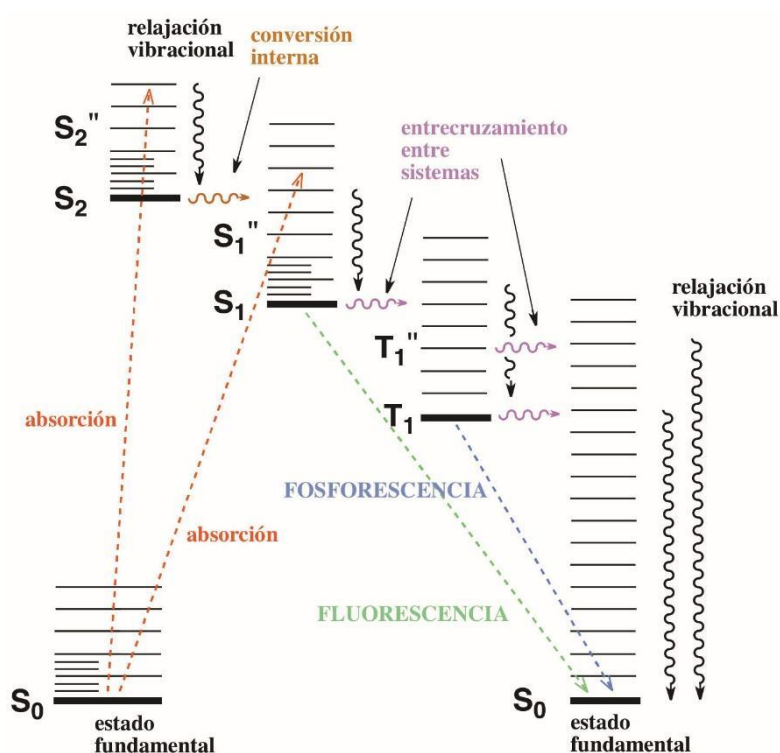


Figura 7. Diagrama de Jablonski.

Como observamos en la figura 7, aunque el proceso de absorción ocurre desde el estado fundamental  $S_0$  hasta cualquiera de los estados excitados  $S_1$ ,  $S_2$ , etc., la emisión de fluorescencia se produce desde el estado excitado de menor energía  $S_1$  debido a una serie de procesos no radiativos (relajación vibracional, conversión interna, etc.) que producen la relajación desde los estados excitados superiores hasta el  $S_1$ . Estos procesos no radiativos también pueden darse en los cruces intersistema desde un estado singlete a uno triplete, en este caso, la relajación del estado  $T_1$  al  $S_0$  se denomina fosforescencia.

Por otro lado, el estado excitado  $S_1$  puede ser desactivado mediante una serie de procesos no radiativos que eliminan o disminuyen los fenómenos de fluorescencia y/o fosforescencia, conocidos como desactivación o *quenching*. Estos procesos no radiativos engloban la desactivación a causa de fenómenos térmicos, por efecto del disolvente, por transferencias de energía con otras moléculas, etc. siendo el PET

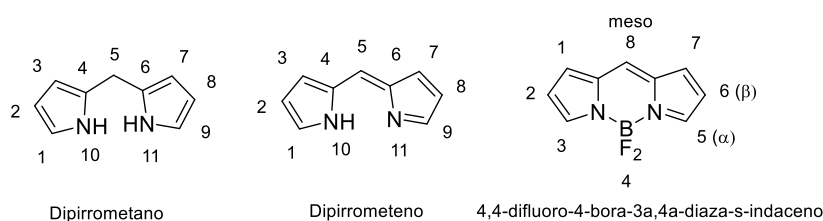
(Photoinduced Electron Transfer) o ICT (Internal Charge Transfer) alguno de los procesos de desactivación más comunes.

Por tanto, la elección de la unidad señalizadora (que albergará dichos cromóforos o fluoróforos) es de vital importancia a la hora de llevar a cabo el diseño de un sensor molecular óptico, ya que muchas de las propiedades finales del sensor, vendrán determinadas por la estructura y características de su unidad señalizadora. Gran parte de los sensores moleculares ópticos, utilizan moléculas orgánicas como unidad señalizadora debido a su fácil manejo y versatilidad estructural. Una de las familias de compuestos orgánicos más utilizadas en los últimos tiempos por sus ventajas como unidad señalizadora son los dipirrometenos de boro (BODIPY, por sus siglas en inglés)<sup>24</sup>.

## 1.3 Borodipirrometenos (BODIPYs)

### 1.3.1 Descripción general

Aunque el primer BODIPY fue sintetizado en 1968 por Treibs y Kreuzer mientras intentaban llevar a cabo la acilación del pirrol con trifluoruro de boro como ácido de Lewis<sup>25</sup>, no ha sido hasta finales del siglo XX que estos compuestos han recibido una atención especial por parte de la comunidad científica. La IUPAC establece una numeración para este tipo de estructuras que difiere ligeramente de la existente para dipirrometanos y dipirrometenos<sup>26</sup> (figura 8).



**Figura 8.** Numeración de dipirrometano, dipirrometeno y BODIPY de acuerdo con la IUPAC.

En todos los casos, el carbono central (C-8) se denomina “meso” (derivado de la nomenclatura de porfirinas), mientras que las posiciones contiguas a los átomos de nitrógeno reciben el nombre de “α” y “β”.

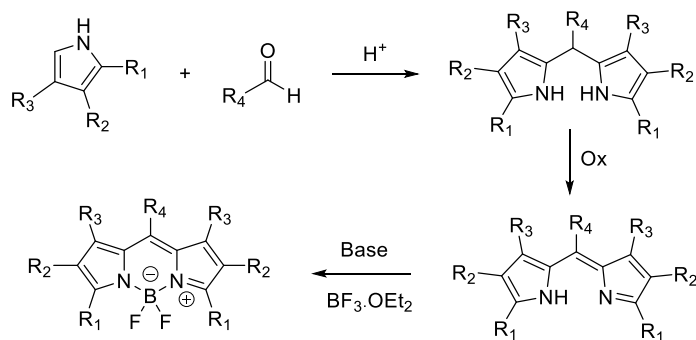
Las moléculas orgánicas que albergan en su estructura un núcleo de BODIPY son generalmente especies coloreadas, debido a que tienen la capacidad de absorber luz dentro del rango de longitudes de onda del espectro visible. Poseen coeficientes de extinción molar ( $\epsilon$ ) superiores a 50000 y rendimientos cuánticos ( $\phi$ ) por encima de 0.6.

### 1.3.2 Síntesis y derivatización

La síntesis de BODIPYs puede llevarse a cabo a través de distintas metodologías de manera relativamente sencilla y todas ellas se caracterizan por utilizar derivados del pirrol como reactivos de partida. Las rutas de síntesis se pueden dividir en 4 grupos principales.

#### Síntesis a partir de pirroles y aldehídos.

Este es quizás el procedimiento más extendido para la síntesis de estos compuestos y se lleva a cabo mediante la condensación catalizada por ácido de un aldehído y un derivado pirrólico para dar lugar al correspondiente dipirrometano. A continuación, un proceso de oxidación origina el consiguiente dipirrometeno y, por último, la complejación con trifluoruro de boro en presencia de una base permite obtener el respectivo BODIPY con un rendimiento moderado (esquema 1). Este método da lugar a la formación de BODIPYs simétricamente sustituidos<sup>27</sup>.

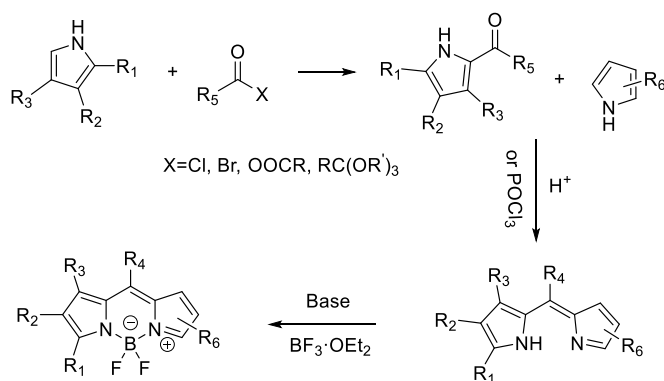


**Esquema 1.** Síntesis de BODIPY a partir de aldehídos y pirroles.

#### Síntesis a partir de pirroles y cloruros de ácido o anhídridos.

Una de las particularidades de este método es que puede llevarse a cabo la síntesis de BODIPYs sustituidos de manera asimétrica, ya que el intermedio generado

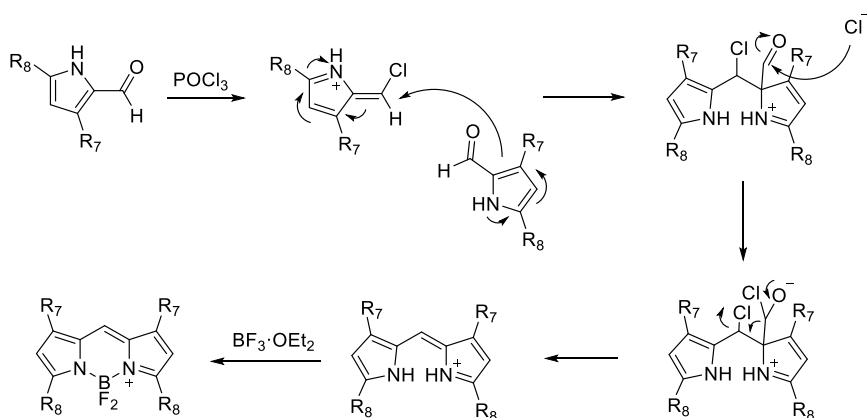
tras la reacción entre el cloruro de ácido<sup>28</sup> o anhídrido<sup>29</sup> y el pirrol (el correspondiente pirrol acilado en  $\alpha$ ) puede aislarse y reaccionar posteriormente con un derivado pirrólico distinto al inicial. Como en el caso anterior, la última etapa es la complejación del dipirrometeno con trifluoruro de boro en presencia de una base, para dar lugar al BODIPY correspondiente (esquema 2).



**Esquema 2.** Síntesis de BODIPY a partir de pirroles y cloruros de ácido o anhídridos.

### Síntesis a partir de pirroles acilados.

Esta metodología fue descrita inicialmente por Wu y Burgess en 2008, diferenciándose de la anterior en la primera etapa de la síntesis, ya que utiliza la autocondensación mediante oxiclorigo de fósforo de una única unidad pirrólica previamente acilada. El mecanismo propuesto por los autores es el que se muestra en el esquema 3. Esta metodología da lugar a BODIPYs simétricamente sustituidos<sup>30</sup>.

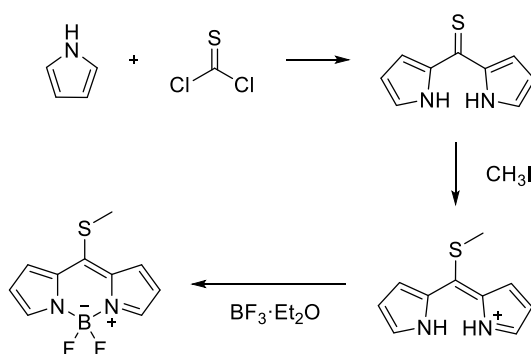


**Esquema 3.** Síntesis de BODIPY a partir de pirroles acetilados.



### Síntesis a partir de pirrol y tiofosgeno

En 2006 Jean-François Biellmann describió la síntesis de un BODIPY que contenía azufre en la posición meso, bajo condiciones suaves y utilizando pirrol y tiofosgeno como materiales de partida<sup>31</sup>. La primera etapa de reacción da lugar a una tiocetona simétrica que tras reaccionar con yoduro de metilo genera el correspondiente dipirrometeno. La adición de trifluoruro de boro produce la complejación y la formación del BODIPY (esquema 4). Esta metodología permite utilizar pirrol sin sustituir como reactivo de partida, ya que reduce en gran medida los problemas de autocondensación del pirrol observados en otras metodologías.

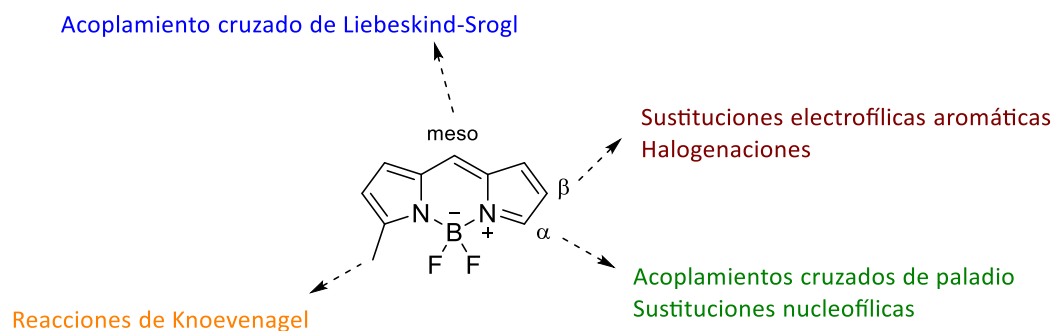


**Esquema 4.** Síntesis de BODIPY a partir de tiofosgeno.

Otra de las características importantes de este procedimiento es que permite sintetizar BODIPYs con otros heteroátomos distintos del azufre en la posición *meso* ya que puede utilizarse el grupo tiometilo como grupo saliente en reacciones de sustitución nucleofílica. Cuando se emplean compuestos de nitrógeno como nucleófilos, se obtienen BODIPYs con propiedades muy interesantes<sup>32</sup>.

### Derivatización

Una de las cualidades, que hace extensivo el uso de los BODIPYs en procedimientos de reconocimiento y detección, es su gran versatilidad estructural, que permite modular tanto las propiedades químicas como espectroscópicas y adaptarlas al analito que se pretenda detectar. Aunque son muchas las reacciones descritas sobre los núcleos de BODIPY, vamos a destacar alguna de ellas (esquema 5).



**Esquema 5.** Principales reacciones de funcionalización de un núcleo de BODIPY.

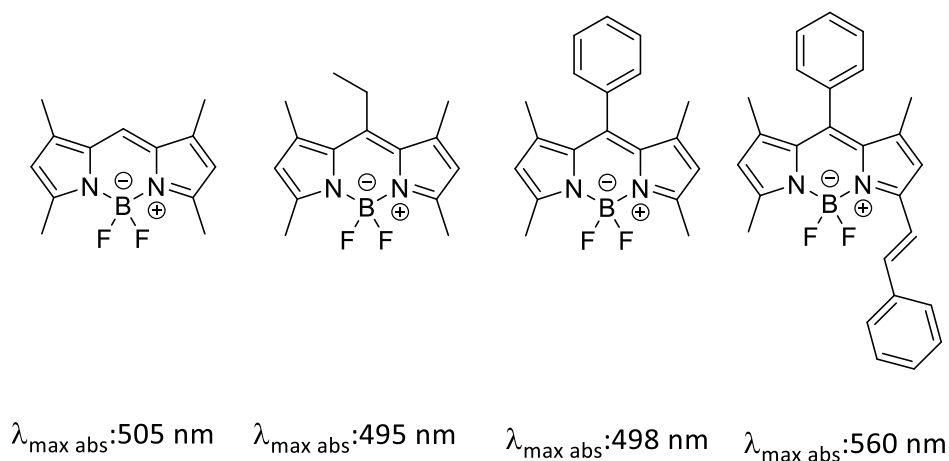
Sobre la posición  $\alpha$  del BODIPY pueden llevarse a cabo acoplamientos cruzados de paladio<sup>33,34</sup>, sustituciones nucleofílicas<sup>35</sup>, etc. La posición  $\beta$  puede ser halogenada con relativa facilidad<sup>36</sup> y llevar a cabo sustituciones electrofílicas aromáticas<sup>37</sup> entre otras. En la posición *meso*, puede realizarse un acoplamiento cruzado de Liebeskind-Srogl utilizando el grupo tiometil descrito anteriormente<sup>38</sup>, introducir un grupo trifluorometilo<sup>39</sup>, etc. Otra posición importante en el núcleo de BODIPY es el metilo presente en la posición  $\alpha$ , ya que debido a su carácter ácido puede sufrir reacciones de Knoevenagel<sup>40</sup> que permiten aumentar la conjugación del cuerpo del BODIPY obteniendo unas propiedades espectroscópicas totalmente diferentes.

### 1.3.3 Propiedades espectroscópicas

Como se ha mencionado anteriormente, las moléculas orgánicas que albergan núcleos de BODIPY en su estructura, son altamente coloreadas, con longitudes de onda de sus máximos de absorción y emisión que abarcan prácticamente todo el espectro visible<sup>41</sup>. Las propiedades espectroscópicas de los núcleos de BODIPY (longitudes de onda de absorción y emisión y rendimiento cuántico) no sufren grandes variaciones a causa de ligeros cambios del pH del medio o efectos solvatocrómicos<sup>42</sup>. Sin embargo, al funcionalizar dichos núcleos con diversos grupos funcionales, se varía su estructura y, por tanto, su estabilidad frente a modificaciones del medio (pH,

disolvente, fuerza iónica), impidiendo generalizar unas condiciones de estabilidad espectroscópica para todos los BODIPY y siendo necesario estudiar cada sistema por separado.

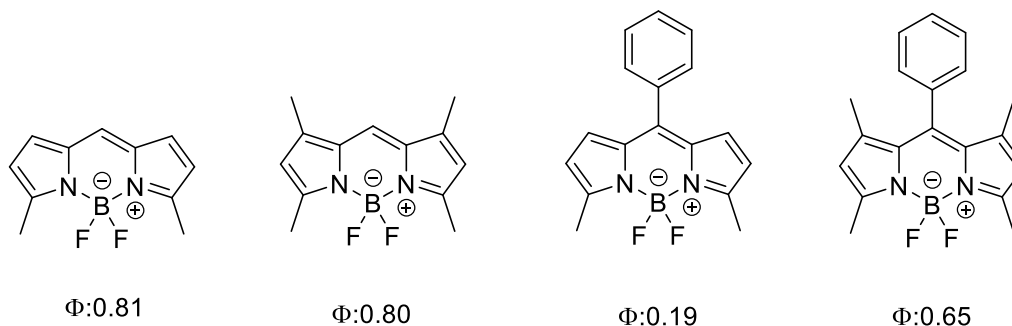
Sin embargo, a la vista de los ejemplos de BODIPY descritos en la bibliografía<sup>43,44</sup>, podemos racionalizar algunos aspectos para tratar de entender y utilizar las variaciones espectroscópicas derivadas de cambios estructurales. En la figura 9 se puede observar cómo los restos alquilo o arilo situados en la posición meso del núcleo del BODIPY no tienen un efecto significativo sobre la longitud de onda máxima de absorción, sin embargo, la extensión de la conjugación del núcleo del BODIPY a través de uno de los metilos situado en la posición  $\alpha$  del anillo, conlleva un desplazamiento considerable del máximo de absorción hacia longitudes de onda mayores.



**Figura 9.** Variaciones en el valor del máximo de absorción del núcleo de BODIPY asociadas a cambios estructurales.

De igual manera, se puede comprobar que la adición de un resto arilo sobre la posición meso, genera una disminución considerable del rendimiento cuántico de la molécula<sup>43</sup> (figura 10), lo que se puede atribuir a que la libre rotación del anillo bencénico favorece la relajación del estado excitado al fundamental a través de procesos no radiativos. Por la misma razón, la adición de grupos metilo contiguos al

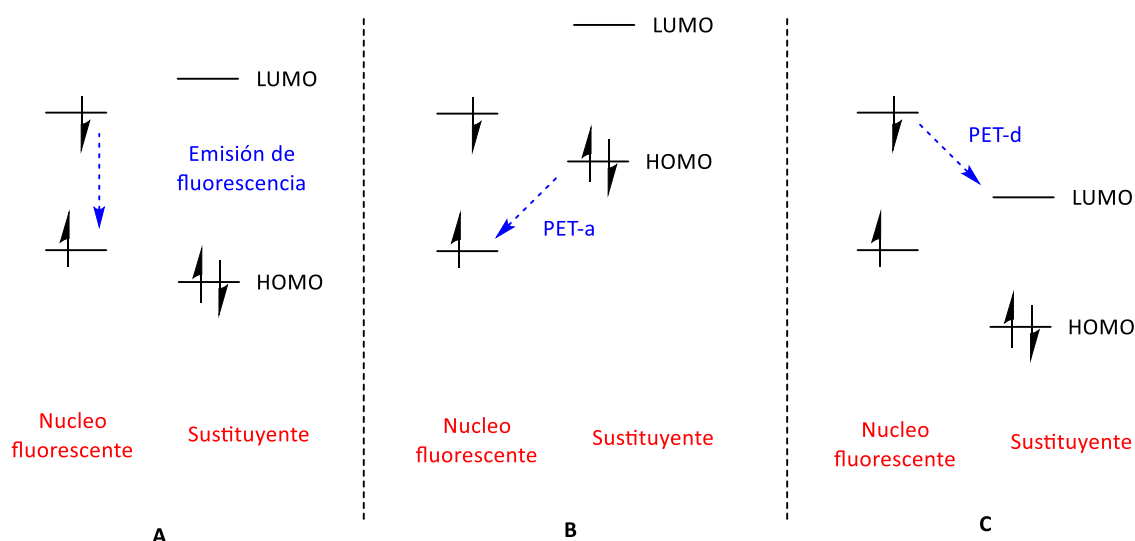
anillo que restringen estéricamente la rotación de dicho anillo produce un aumento en el rendimiento cuántico de la molécula.



**Figura 10.** Variaciones en el rendimiento cuántico del núcleo de BODIPY asociadas a cambios estructurales.

### 1.3.4 Transferencia electrónica fotoinducida

Entre los diversos fenómenos que pueden modificar las propiedades espectroscópicas y más en concreto el rendimiento cuántico de emisión de fluorescencia, vamos a centrarnos en uno de los más importantes: la transferencia electrónica fotoinducida (PET, por sus siglas en inglés)<sup>45</sup>. La emisión de fluorescencia consiste en la emisión de un fotón de energía como consecuencia de la relajación de un electrón desde su estado excitado singlete al fundamental. Sin embargo, la presencia en la molécula de sustituyentes con orbitales cercanos energéticamente a los estados fundamental y excitado del núcleo fluorescente puede dar lugar a la transferencia de un electrón desde el dador al aceptor, generando un estado con separación de cargas que finalmente permite recuperar el estado fundamental mediante un proceso no radiativo, cancelando la emisión de fluorescencia de la molécula. El siguiente esquema representa dichos procesos (esquema 6).

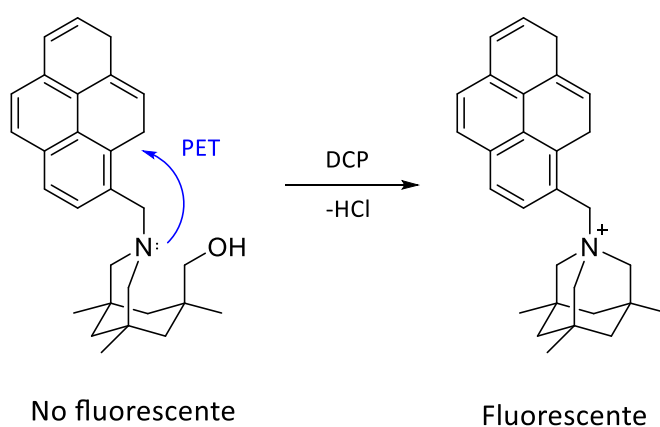


**Esquema 6.** Representación del proceso de transferencia electrónica fotoinducida mediante estados energéticos.

En el caso **A** observamos la relajación de un electrón desde el estado excitado del núcleo fluorescente al estado fundamental, produciéndose la emisión de fluorescencia. En el caso **B**, observamos que el orbital HOMO del sustituyente dador se encuentra más cercano energéticamente al estado fundamental del núcleo fluorescente que su propio estado excitado, produciéndose la transferencia de un electrón entre ambos (PET-aceptor). Esto impide que el electrón del estado excitado vuelva a su estado fundamental, lo que se traduce macroscópicamente en una supresión o disminución de la fluorescencia. En el caso **C**, observamos cómo el estado excitado del núcleo fluorescente está más próximo energéticamente al orbital LUMO del sustituyente no planar (que ahora actúa como aceptor) que, de su propio estado fundamental, produciéndose de nuevo la transferencia de un electrón entre ambos (PET-dador), eliminando la emisión fluorescente.

Existen numerosos ejemplos de transferencia electrónica fotoinducida descritos en la bibliografía aplicada a procesos de detección<sup>46</sup>, uno de ellos es el descrito en 2006 por Julius Rebek<sup>47</sup>, donde presenta un sensor fluorescente para la detección de clorofosfato de dietilo (DCP, por sus siglas en inglés), que es un simulante

de agentes de guerra química organofosforados (esquema 7). En él se describe el fenómeno PET que sufre el sensor antes de reaccionar con el analito, debido a la transferencia electrónica desde el par de electrones no enlazantes del grupo amino al núcleo de pireno. Tras llevarse a cabo la reacción con DCP, el nivel energético del orbital que contenía el par de electrones del nitrógeno varía, impidiendo la transferencia electrónica fotoinducida hacia el núcleo de pireno y permitiendo así el retorno del electrón excitado a su estado fundamental mediante un proceso radiativo, traduciéndose en una aparición de fluorescencia.



**Esquema 7.** Ejemplo de quimiodosímetro que presenta una desactivación de la fluorescencia por un proceso PET y que en presencia de un analito recupera la emisión de fluorescencia.

El conocimiento de la relación entre la estructura del BODIPY y sus propiedades espectroscópicas ha permitido el diseño y la síntesis de moléculas que presentan unas características orientadas a desempeñar una función concreta. Eso ha generado en los últimos años, un gran desarrollo de sensores químicos que incorporan núcleos de BODIPY en su estructura para la detección de todo tipo de especies iónicas y neutras.

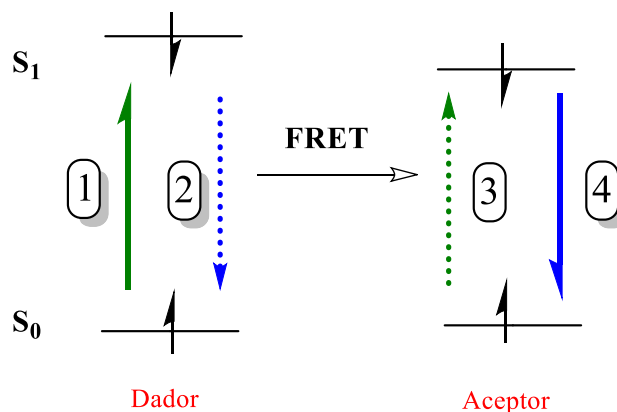
### 1.3.5 Compuestos cassette basados en BODIPYs

Ciertas propiedades espectroscópicas de los BODIPYs han servido para utilizarlos como sensores, sin embargo, estas mismas propiedades que son beneficiosas para ciertas aplicaciones, pueden restringir o limitar el potencial de dichas moléculas en otras distintas. En concreto, una de estas propiedades es el desplazamiento de Stokes<sup>48</sup> (diferencia entre la longitud de onda máxima de emisión y la longitud de onda máxima de absorción de una molécula), que es relativamente bajo para algunas moléculas (alrededor de 25 nm) y puede dar lugar a fenómenos de solapamiento espectral, problemas de autodesactivación de fluorescencia y errores en la detección a causa de efectos de “backscattering”, ocasionando que estos compuestos no sean aptos para aplicaciones en sistemas biológicos, marcadores moleculares o visualización celular.

De igual modo, la medición de un aumento en la emisión de fluorescencia sin la existencia de un desplazamiento sustancial en la longitud de onda de excitación o emisión puede estar influenciada por muchos factores como la localización del sensor, cambios en el entorno (pH, polaridad, temperatura, etc.), cambios en la intensidad de excitación y la eficiencia de recolección de emisión entre otros.

Una de las estrategias utilizadas para tratar de reducir el efecto de dichos factores, es el registro simultáneo de la intensidad de fluorescencia a dos longitudes de onda distintas, obteniendo la relación o ratio entre las intensidades a ambos máximos<sup>49</sup>. En este sentido, en los últimos años se ha llevado a cabo un gran desarrollo en la exploración de sistemas multifluoróforo<sup>50</sup> con arquitecturas dador-aceptor o “cassettes de transferencia de energía”<sup>51</sup>, ya que estos pueden dar lugar a aumentos virtuales en el desplazamiento de Stokes y, por tanto, amplían el rango de aplicación de estos compuestos.

Este tipo de sistemas está dominado principalmente por dos mecanismos de transferencia energética, que describen la transferencia de energía entre los dos cromóforos y/o fluoróforos. El primero de ellos recibe el nombre de transferencia de energía de resonancia de Förster o *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET, por sus siglas en inglés)<sup>52</sup> y aparece esquematizado en el siguiente esquema (esquema 8).

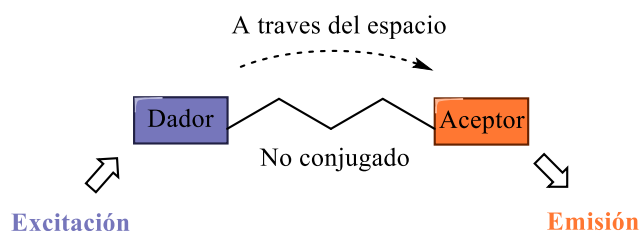


**Esquema 8.** Representación del proceso de transferencia de energía de resonancia de Förster mediante estados energéticos.

Inicialmente el cromóforo o fluoróforo que actúa como donador es excitado desde su estado fundamental ( $S_0$ , **1**) y posteriormente se relaja hasta su estado excitado de menor energía ( $S_1$ ). A continuación, si el cromóforo o fluoróforo que actúa como aceptor cumple una serie de requisitos, la energía liberada a través de un proceso no radiativo (**2**) asociada al retorno de un electrón a su estado fundamental, puede simultáneamente ser absorbida por la unidad aceptora a través de un acoplamiento dipolo-dipolo no radiativo y pasar a un estado excitado (**3**). Por último, la unidad aceptora puede emitir un fotón volviendo a su estado fundamental, dando lugar al fenómeno de la fluorescencia (**4**).

Los compuestos que obedecen a este tipo de mecanismo están formados por una unidad dadora y otra aceptora unidas mediante un espaciador no conjugado y la transferencia de energía tiene lugar a través del espacio (figura 11).





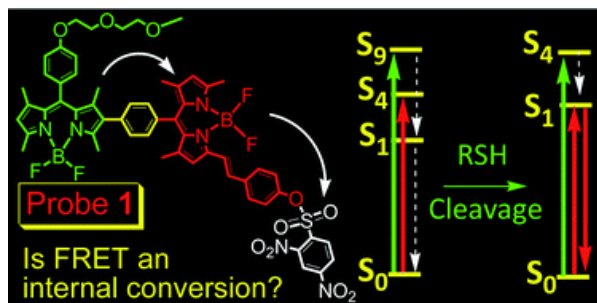
**Figura 11.** Esquema de las partes de una molécula que obedece a un mecanismo de transferencia de energía de resonancia de Förster.

Aunque este mecanismo permite aumentar virtualmente el desplazamiento de Stokes respecto a las subunidades por separado, son necesarios una serie de requisitos:

- Proximidad espacial entre el dador y el aceptor (menor de 10 nm).
- Alto rendimiento cuántico por parte de la subunidad dadora.
- Solapamiento importante entre el espectro de emisión del dador y el espectro de absorción del aceptor.
- Alineamiento de los momentos de transición de absorción y emisión y su vector de separación.

Un ejemplo del uso de esta metodología en el diseño de sensores es el desarrollado por Zhao, James *et al*<sup>53</sup>. El sistema consiste en dos BODIPYs unidos mediante un anillo de benceno como espaciador y uno de ellos funcionalizado con un grupo 2,4-dinitrobenzenosulfonilo (DNBS por sus siglas en inglés) que produce la desactivación inicial de la fluorescencia del BODIPY. El BODIPY que actúa como dador (marcado en verde en la figura 12) tiene una  $\lambda_{\text{abs}} = 498$  nm y  $\lambda_{\text{em}} = 511$  nm mientras que el que actúa como aceptor (marcado en rojo en la figura 12) tiene una  $\lambda_{\text{abs}} = 568$  nm y  $\lambda_{\text{em}} = 586$  nm. Inicialmente, el quimiosímetro no presenta emisión de fluorescencia, mientras que tras la adición de cisteína o homocisteína se produce la rotura del grupo DNBS, observando la emisión de fluorescencia del sistema a 590 nm

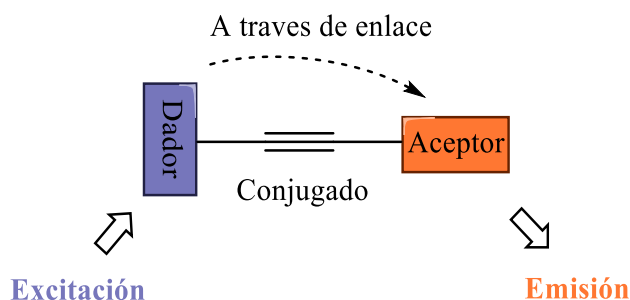
(BODIPY aceptor marcado en rojo) tras excitar a 505 nm (BODIPY dador marcado en verde) poniendo de manifiesto el proceso de transferencia energética (figura 12).



**Figura 12.** Quimiosensado desarrollado por Zhao, James *et al.* para la detección de cisteína o homocisteína mediante un proceso de FRET. Imagen extraída del trabajo publicado en “*Chem. Sci.* **2012**, 3, 1049-1061” con permiso de la editorial.

Aunque esta estrategia ha sido aplicada con éxito dentro del campo del análisis estructural de ADN<sup>54,55</sup>, regulación de ácidos nucleicos<sup>56</sup>, estructura de proteínas<sup>57</sup>, inmunoensayos<sup>58</sup>, etc. todavía está presente una limitación inherente al método, la necesidad de un solapamiento espectral entre la emisión del dador y la absorción del aceptor, así como cierta proximidad espacial, lo que limita en gran medida la variabilidad estructural disponible y la elección de ambas unidades.

El segundo tipo de mecanismo de transferencia energética entre dos cromóforos y/o fluoróforos, que además consigue dejar de lado esta limitación es la transferencia de energía a través de enlace (TBET, por sus siglas en inglés), que consiste en una estructura multifluoróforo donde dador y aceptor están conectados a través de un espaciador electrónicamente conjugado<sup>59</sup> (figura 13). De modo que siempre y cuando el proceso de transferencia energética sea más rápido que las rutas de decaimiento no radiativas, el proceso TBET no estará limitado por el requerimiento de solapamiento espectral.



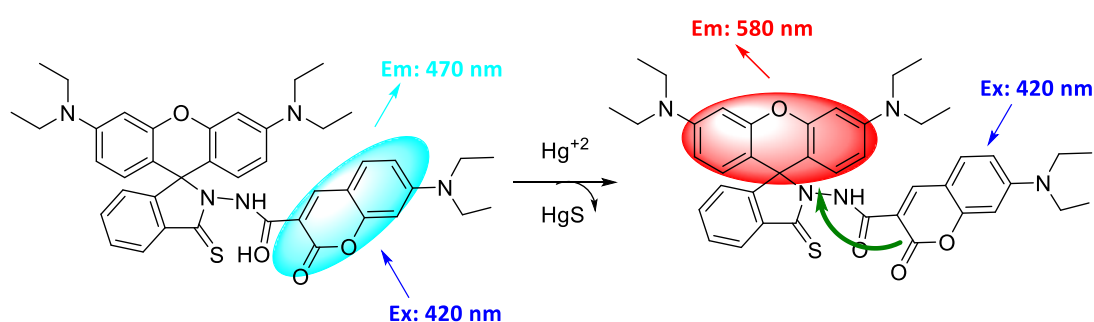
**Figura 13.** Esquema de las partes de una molécula que obedece a un mecanismo de transferencia de energía a través de enlace.

A pesar de ello, existen como en el caso anterior, una serie de requisitos necesarios para que tenga lugar este mecanismo:

- El componente que actúa como dador debe presentar una gran absorbanza a la longitud de onda de excitación.
- El componente que actúa como aceptor debe exhibir una fluorescencia intensa.
- Ambos componentes deben presentar en su estructura grupos funcionales que permitan su unión mediante espaciadores.
- El espaciador debe impedir la disposición planar del dador y el aceptor, con el objeto de evitar que el sistema se comporte como un único cromóforo conjugado en lugar de dos componentes separados.

Esta estrategia ha sido ampliamente utilizada durante los últimos años en el diseño de sensores, un ejemplo de ello es el descrito por Zhang *et al*<sup>59</sup>. en 2012. En él observamos el uso de rodamina B y cumarina como unidad aceptora y dadora respectivamente. Ambas unidades están unidas mediante una tiosemicarbazida como espaciador (que a la vez actúa como unidad de reconocimiento). Inicialmente, tras excitar a la longitud de absorción máxima de la cumarina (420 nm, unidad dadora) se produce la emisión de fluorescencia a 470 nm (correspondiente a la longitud máxima de emisión de la cumarina), lo que nos indica que no se ha producido ninguna transferencia energética entre ambas unidades. Sin embargo, tras añadir  $\text{Hg}^{2+}$  al

sistema, este reacciona con el grupo tiosemicarbazida produciendo una desulfuración y generando un sistema conjugado entre ambas unidades. Debido a esto, al excitar nuevamente a 420 nm, se produce la emisión de fluorescencia a 580 nm (correspondiente a la longitud máxima de emisión de la rodamina B) poniendo de manifiesto la existencia de un proceso de transferencia energética entre ambas unidades (figura 14).



**Figura 14.** Dosímetro desarrollado por Zhang *et al.* haciendo uso de la metodología TBET. Imagen extraída del trabajo publicado en “*Anal. Chem.* **2012**, *84*, 10777-10784” con permiso de la editorial.

El diseño de cassettes de transferencia de energía basados en BODIPY para su uso en detección implica dos puntos principales. El primero de ellos es la elección de la molécula unida al núcleo de BODIPY, que será la responsable de interaccionar con el analito y generar una respuesta medible. En segundo lugar, la elección del espaciador utilizado para unir ambas unidades, ya que de ello dependerán factores como la separación entre dador y aceptor y el tipo de transferencia energética que tendrá lugar. En ocasiones, la utilización de un espaciador adecuado puede desembocar en una transferencia de energía tanto a través de enlace (TBET) como a través del espacio (FRET), aumentando así la eficiencia de dicha transferencia.

## 1.4 Nanopartículas de oro funcionalizadas para aplicaciones en detección

### 1.4.1 Materiales híbridos orgánicos-inorgánicos

La evolución de los sensores tradicionales en los que una única molécula lleva a cabo el proceso de reconocimiento y detección, el desarrollo de nuevos soportes inorgánicos con un amplio rango de tamaños y características y la aparición de nuevas necesidades en campos como la biomedicina y la biotecnología han llevado al desarrollo de nuevos materiales híbridos donde se combinan tanto moléculas orgánicas como soportes inorgánicos con el objetivo de obtener sistemas con nuevas propiedades físicas y químicas<sup>60</sup>.

En la mayoría de los materiales híbridos se mantiene la arquitectura general de un sensor (unidad de reconocimiento-unidad señalizadora), sin embargo, no están obligados a contener ambas partes en una misma molécula lo que limitaría sus características y aplicaciones, ya que la posibilidad de utilizar moléculas o soportes de distinta naturaleza y combinarlos para llevar a cabo tanto el proceso de reconocimiento como el proceso de señalización o transducción permite ampliar el rango de aplicación de estos sistemas y en algunos casos, mejorar las propiedades ya existentes<sup>61</sup>. Algunas de las propiedades que hacen atractivos a este tipo de materiales híbridos son:

- La mayoría de los soportes inorgánicos empleados son sólidos, dando lugar a materiales híbridos con unas propiedades excelentes en cuanto a manejo y transporte.
- El uso de sistemas híbridos o multicomponente añade una mayor variabilidad estructural, permitiendo modificar una mayor cantidad de factores, ajustando y optimizando las propiedades del sistema para realizar una función muy concreta.

Entre los muchos tipos de materiales híbridos orgánicos-inorgánicos desarrollados en los últimos años, los más utilizados por su versatilidad son la sílice mesoporosa y las nanopartículas de oro.

La sílice mesoporosa es un material formado por sílice con una estructura porosa, cuyo diámetro de poro puede variar modificando sus propiedades y aplicaciones. Así, podemos clasificarlos en microporos (diámetro de poro  $< 2$  nm), mesoporos (diámetro de poro 2-50 nm) y macroporos (diámetro de poro  $> 50$  nm)<sup>62</sup>. La posibilidad de modular el tamaño de poro deseado para estos materiales permite su utilización en campos muy diversos como la catálisis<sup>63</sup>, procesos de separación y filtrado<sup>64</sup>, liberación de fármacos<sup>65</sup> y desarrollo de sensores<sup>66</sup> entre otros.

Por otro lado, uno de los materiales que más atención ha recibido en los últimos años, son las nanopartículas de oro, con un gran desarrollo dentro del campo de las aplicaciones químicas y biomédicas y cuyas principales características describimos a continuación.

### 1.4.2 Descripción general

Muchas medicinas tradicionales han utilizado suspensiones coloidales de oro para tratar diversas patologías. En 1971 Faulk y Taylor<sup>67</sup> describieron uno de los primeros métodos para la conjugación de anticuerpos con una suspensión coloidal de oro con fines biológicos, sin embargo, no ha sido hasta la aparición y desarrollo de la nanotecnología, que estas suspensiones coloidales de oro han sido objeto de un estudio en profundidad<sup>68</sup>.

Consideramos como nanopartículas de oro (AuNPs) aquellas suspensiones coloidales formadas por partículas de dicho metal cuyo diámetro se encuentra entre 1 y 100 nm. Dichas suspensiones poseen una coloración que oscila entre rojo y azul dependiendo de varios factores como la forma de las nanopartículas, su tamaño, los

ligandos que rodean al núcleo de oro, el medio en el que están dispersas o la distancia interpartícula<sup>69</sup>.

Esta coloración es debida a la oscilación colectiva de los electrones de la banda de conducción inducida por la interacción con un campo electromagnético (la luz, por ejemplo). Este efecto es conocido como resonancia del plasmón superficial<sup>70</sup> (SPR, por sus siglas en inglés) y da lugar a bandas de absorción intensas en el visible. Estas bandas SPR únicamente se observan en suspensiones coloidales metálicas de un tamaño de partícula concreto, ya que no se observa para átomos aislados o tamaños de partícula macroscópicos.

Algunas características que han extendido el uso de nanopartículas de oro a campos tan diversos como la detección de iones<sup>71</sup>, especies neutras<sup>72</sup>, biomarcadores<sup>73</sup>, liberación de fármacos<sup>74</sup>, catálisis<sup>75</sup>, etc., son las siguientes:

- Poseen unas propiedades ópticas y electroquímicas fuertemente dependientes del tamaño y la forma de la nanopartícula, permitiendo modificar dichas propiedades dependiendo del método de síntesis.
- Presentan una estabilidad química elevada, permitiendo su almacenamiento<sup>76</sup>.
- Pueden ser funcionalizadas en su superficie con uno o varios ligandos mejorando su versatilidad o especificidad según convenga<sup>77</sup>.
- Al tratarse de una suspensión coloidal acuosa, permiten que las moléculas o ligandos orgánicos anclados a su superficie, desarrollen su función en medios biológicos o no orgánicos.
- Tienen una alta relación superficie-volumen, especialmente útil en procesos de catálisis.

Una de las razones del uso extensivo de estos materiales en el campo de los sensores, es que en la actualidad existen diversos métodos de síntesis que dan lugar a nanopartículas de oro con una dispersión de tamaños pequeña, lo que permite

predecir y diseñar con fiabilidad sistemas basados en nanopartículas con unas características específicas para el analito a detectar.

### 1.4.3 Métodos de síntesis y funcionalización

En la actualidad existen numerosos métodos para llevar a cabo la síntesis de nanopartículas de oro y cada uno de ellos tiene unas particularidades que dan lugar a nanopartículas con forma, tamaño y propiedades distintas. Podemos englobar todos estos métodos en dos grandes grupos. Aquellos métodos que parten de átomos aislados que se van ensamblando hasta alcanzar la estructura deseada (métodos “bottom up”) y los métodos que parten de un material de tamaño macroscópico y van eliminando material hasta alcanzar la estructura deseada (métodos “top down”)<sup>78</sup>. Los métodos más extendidos para la preparación de nanopartículas de oro se engloban dentro del primer grupo. Debido a la gran cantidad procedimientos tanto químicos como biosintéticos existentes para la formación de nanopartículas, vamos a centrarnos en dos de los más importantes:

#### Método Turkevich-Frens

El desarrollo de este método tiene su inicio en 1951 cuando Turkevich llevó a cabo la reducción de iones de oro ( $\text{Au}^{+3}$ ) a átomos de oro ( $\text{Au}^0$ ) usando agentes reductores como citrato sódico<sup>79</sup>, ciertos aminoácidos o ácido ascórbico, dando lugar a nanopartículas de oro esféricas con un tamaño entre 10 y 20 nm. En 1973 se produjo la optimización de este método por parte de Frens, quién observó que modificando la relación oro-citrato (o el correspondiente agente reductor/estabilizante) se conseguía obtener nanopartículas de oro esféricas con un mayor rango de tamaños, llegando a obtener nanopartículas entre 15 y 150 nm. Posteriormente se han realizado diversos estudios con el objetivo de entender y predecir el efecto de factores como el disolvente, el pH del medio, la temperatura, adición de estabilizantes, etc., llegando a



obtener modelos bastante precisos para la obtención de nanopartículas de oro de un amplio rango de tamaños<sup>80</sup>.

### Método Brust

Fue descrito por Brust en 1994 y consiste en la utilización de un sistema de dos fases (fase orgánica y fase acuosa) para la preparación de nanopartículas de oro esféricas con un tamaño comprendido entre 1 y 5 nm<sup>81</sup>. Este método consiste en la utilización de un agente de transferencia de fase (bromuro de tetraoctilamonio, TOAB por sus siglas en inglés) para desplazar la sal de oro correspondiente ( $\text{AuCl}_4^-$ ) desde la fase acuosa a la fase orgánica (tolueno), donde mediante un reductor, el borohidruro de sodio y en presencia de un alcanotiol como estabilizante, se produce la reducción de la sal de oro a  $\text{Au}^0$  seguido de nucleación y estabilización de las nanopartículas en la fase orgánica por recubrimiento con una monocapa de alcanotiol.

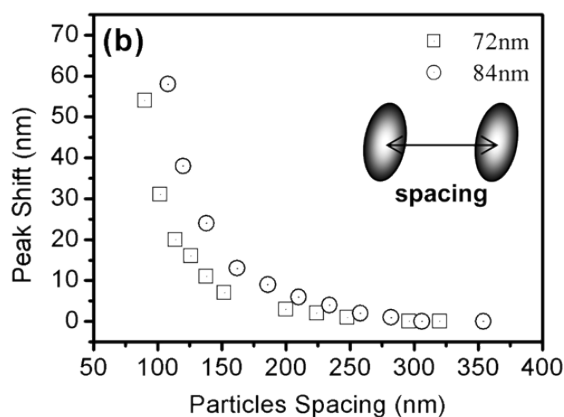
#### 1.4.4 Aplicaciones en detección

Como hemos descrito anteriormente, la banda de resonancia del plasmón superficial dota de color a las suspensiones de nanopartículas de oro, con un máximo de absorción entre 500 y 600 nm. Entre todos los factores que pueden modificar dicha banda, los más importantes son el tamaño de partícula y la distancia interpartícula. En 1999 Mostafa A. El-Sayed y Sthepan Link<sup>69</sup> demostraron experimentalmente cómo el máximo de absorción de una suspensión de nanopartículas de oro se desplazaba a longitudes mayores a medida que aumentaba el tamaño de partícula (tabla 1).

Diámetro (nm)	Desviación estándar (%)	$\lambda$ (nm)
8.9	13	517
14.8	12	520
21.7	9	521
48.3	11	533
99.3	11	575

**Tabla 1.** Longitud de onda de la banda de resonancia del plasmón superficial para distintos tamaños de nanopartículas de oro. Datos extraídos del trabajo publicado en *J. Phys. Chem. B* 1999, 103, 4212-4217.

Sin embargo, la modificación de la distancia interpartícula con el objetivo de desplazar el máximo de absorción de la banda de resonancia del plasmón ha sido el fenómeno más utilizado para el diseño de sensores basados en nanopartículas de oro. X. Zhang estudio en 2003<sup>82</sup> la relación entre el espacio interpartícula y el desplazamiento de la banda de resonancia del plasmón (figura 15).

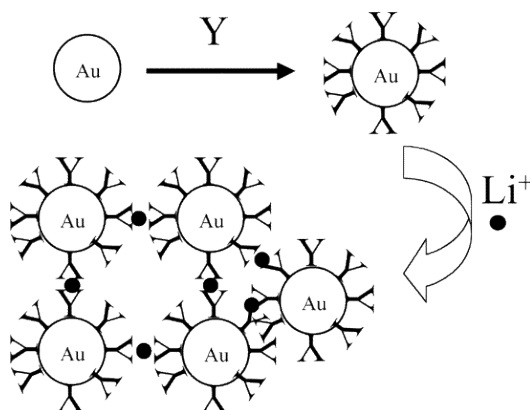


**Figura 15.** Representación del desplazamiento de la longitud de onda de la banda de resonancia del plasmón superficial frente al espacio interpartícula. Imagen extraída del trabajo publicado en “*Nano Lett.* 2003, 3, 1087-1090” con permiso de la editorial.

Como se observa en la imagen anterior, a medida que disminuye la distancia interpartícula se produce un mayor desplazamiento del máximo de absorción. Para una suspensión de nanopartículas de un tamaño aproximado de 25 nm, este efecto se

traduce en el paso de un color rojizo centrado a 525 nm cuando las nanopartículas están dispersas (espacio interpartícula alto) a un color azulado centrado a 630 nm cuando las nanopartículas se encuentran agregadas (espacio interpartícula bajo). Esta variación de color de rojo a azul es un cambio macroscópico observable por el ojo humano a concentraciones muy bajas de nanopartículas lo que hace de éstas una herramienta muy utilizada en el diseño de sensores.

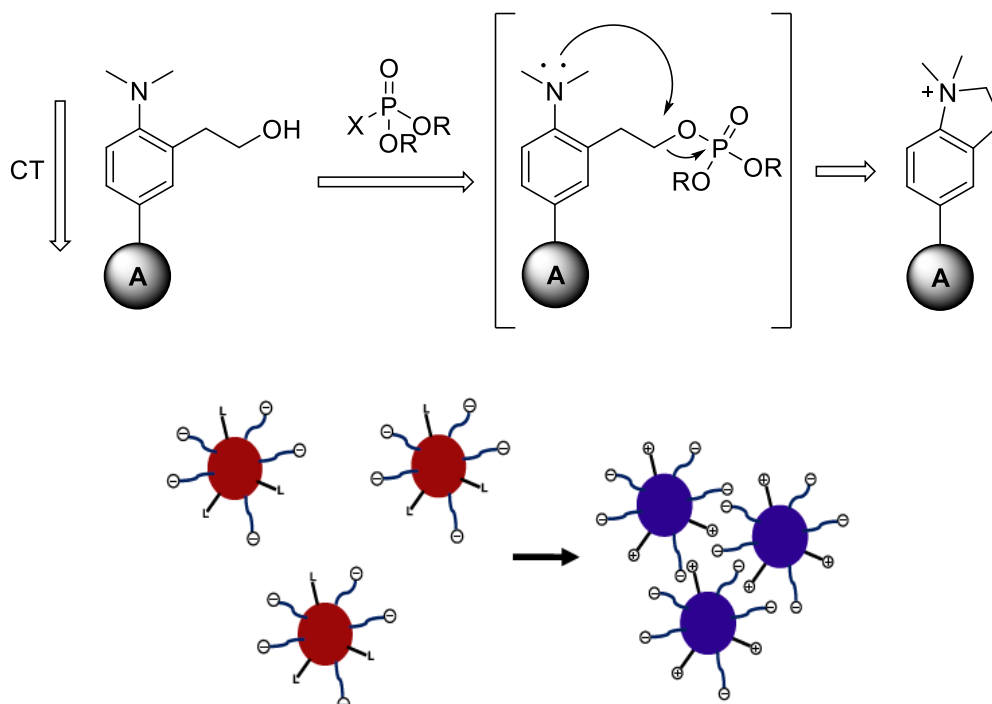
Así, por ejemplo, en 2002 Murphy *et al*<sup>83</sup>. desarrollaron un sensor basado en nanopartículas de oro para la detección del ion  $\text{Li}^+$ . El reconocimiento se llevó a cabo mediante la funcionalización de la superficie de las nanopartículas de oro con el ligando 1,10-fenantrolina, que interacciona selectivamente con  $\text{Li}^+$  formando un complejo ligando-analito de estequiometría 2:1. Debido a esto, se produce la agregación de la suspensión de nanopartículas con el correspondiente cambio de color de rojo a azul asociado (figura 16).



**Figura 16.** Sensor basado en el uso de nanopartículas de oro para la detección de  $\text{Li}^+$  desarrollado por Murphy *et al*. Imagen extraída del trabajo publicado en “*Langmuir*. **2002**, *18*, 10407-10410” con permiso de la editorial.

De igual modo, en 2013 nuestro grupo de investigación desarrolló un sensor basado en nanopartículas de oro para la detección de un simulante de agentes de guerra química<sup>84</sup> (DCNP). Como podemos observar en la figura 17, la superficie de las nanopartículas de oro se funcionalizó con un grupo 2-[2-(dimetilamino)fenil]etanol que tras reaccionar con DCNP produce la fosforilación del grupo hidroxilo generando el

intermedio II, el cual sufre una N-alquilación intramolecular que da lugar a una sal de amonio cuaternaria. Este proceso genera una carga positiva en la superficie, neutralizando parcialmente la carga negativa inicial de las nanopartículas, desestabilizándolas y dando lugar a un fenómeno de agregación con el correspondiente cambio de color asociado.



**Figura 17.** Ejemplo de sensor basado en la agregación de nanopartículas de oro para la detección de DCNP.

## 1.5 Formaldehído

El formaldehído es uno de los compuestos orgánicos más importantes en la industria química, con una producción global superior a 52 millones de toneladas por año. Una gran parte del formaldehído producido se utiliza en la elaboración de resinas utilizadas en la industria de la madera y el mueble para la fabricación de productos de madera prensada como tableros de partículas o fibras y sus derivados. También encontramos formaldehído en laboratorios médicos, morgues, en algunos productos de cuidado personal debido a sus propiedades antibacteriales y de forma endógena a través de diversos procesos biológicos como la desmetilación de aminoácidos N-metilados y bases nitrogenadas del ADN y ARN<sup>85</sup>. De forma más minoritaria, el formaldehído está presente como subproducto en la combustión de algunos compuestos orgánicos, en el humo del tabaco y los automóviles, etc. Sin embargo, la concentración más alta de este gas se encuentra en aquellas industrias o entornos laborales que producen o utilizan formaldehído como parte de su actividad.

El formaldehído es un gas incoloro en condiciones normales de presión y temperatura (p.e= -21 °C), de olor penetrante y con una alta solubilidad en agua (400 g/L). Debido a que el formaldehído no está disponible comercialmente de manera aislada y aprovechando su alta solubilidad en agua, la obtención y el método de trabajo con esta sustancia es a través de sus disoluciones acuosas (formalina), cuyo contenido en formaldehído puede llegar hasta el 37%. Otra de las formas más extendidas para utilizar y generar formaldehído es a través de paraformaldehído, su producto de polimerización. Se presenta en forma de un sólido blanco y suele presentar un grado de polimerización entre 8 y 100 unidades. La forma más característica de obtener formaldehído a partir de paraformaldehído es mediante calor.

Por lo que respecta a las propiedades químicas del formaldehído, es una molécula altamente reactiva debido a su carácter electrófilo y, por tanto, reacciona fácilmente con especies nucleófilas. Este hecho está en el origen de uno de los problemas más graves asociados a la exposición a formaldehído, su capacidad para producir un entrecruzamiento de las bases nitrogenadas del ADN.

Los principales efectos adversos de la exposición a formaldehído son irritación de nariz y garganta o sensación de quemazón en los ojos cuando la concentración de formaldehído en el aire está entre 1 y 10 ppm<sup>86</sup>. Cabe destacar que los efectos inmediatos de la exposición a formaldehído han sido ampliamente estudiados, sin embargo, la información acerca de los efectos sobre la salud derivados de una exposición prolongada es más limitada. Por estos motivos, organizaciones como la “International Agency for Research on Cancer” (IARC)<sup>87</sup> o el “National Toxicology Program” han incluido al formaldehído dentro del catálogo de compuestos carcinógenos para el ser humano<sup>88</sup>. Por tanto, debido al uso extendido de formaldehído en diversos sectores, su volatilidad y toxicidad, el desarrollo de sensores para su detección es un campo de gran interés.

La detección de formaldehído en aire suele llevarse a cabo a través de métodos espectrométricos<sup>89</sup> mientras que las técnicas de cromatografía líquida son más utilizadas para su detección en medios acuosos<sup>90</sup>. De igual modo, técnicas como fluorescencia inducida por láser<sup>91</sup>, electroforesis capilar<sup>92</sup>, conductimetría<sup>93</sup>, biosensores basados en enzimas<sup>94</sup>, análisis de inyección de flujo, tubos detectores de gas<sup>89,95</sup>, etc., son ampliamente utilizadas. Sin embargo, estas técnicas presentan ciertas limitaciones prácticas debido a su alto coste, su complejidad, la necesidad de personal experimentado para su manejo, la falta de portabilidad y en ciertos casos la dificultad para realizar medidas en tiempo real. En contraste con las técnicas nombradas, el uso de sensores como y/o fluorogénicos puede eliminar o reducir algunas de las limitaciones nombradas anteriormente debido a que estos sensores pueden utilizarse

*in situ*, no suelen necesitar un pretratamiento de la muestra, requieren equipamiento de bajo coste y en muchas ocasiones la detección puede observarse visualmente<sup>96</sup>.

Muchos de estos sensores se utilizan para la detección de formaldehído en tejidos, células o incluso órganos animales<sup>97,98,99</sup>. De igual modo, existen numerosos ejemplos para la detección de formaldehído en distintos disolventes como agua, metanol o dimetilformamida<sup>100</sup>. Podemos observar las características principales de algunos de estos sensores en la tabla 2.

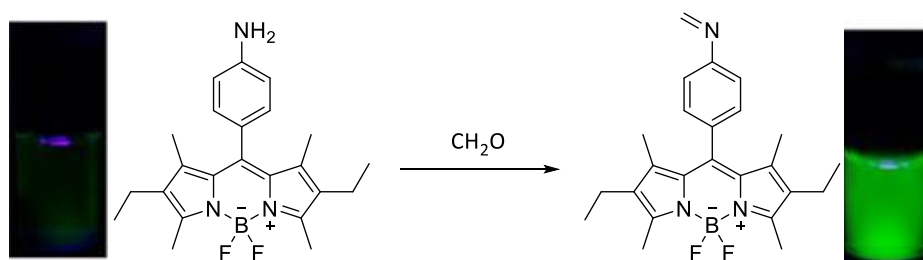
Descripción	Formato formaldehído	LdD (μM)	Interferentes	Referencia	Observaciones
Desactivación fluorescencia (PET)	Disuelto en metanol	0.17	No indicados	101	Componentes no disponibles comercialmente
Aparición fluorescencia (Reacción Aza-Cope)	Disuelto en PBS-CH <sub>3</sub> CN	400	Selectivo frente a 9 interferentes	102	Tiempo de respuesta largo
Derivado de Rodamina B	Disuelto en DMF	No indicado	No indicados	103	LdD e interferentes no indicados
Nanoclusters de plata y reactivo de Tollens	Disuelto en agua	28	Selectivo frente a 25 interferentes	104	Solo en disolución
Nanopartículas de sílica funcionalizadas	Disuelto en agua	1.6	Selectivo frente a 6 interferentes	105	Solo en disolución
Nanopartículas de oro + biosensor	Disuelto en agua	0.1	Selectivo frente a acetaldehído	100	Baja estabilidad del sensor

			y metanol		
Reactivo de Purpald®	Estado gaseoso	2.6	No indicados	106	Complejo, no indica interferentes
Reacción de Hantzsh	Estado gaseoso	0.3	No indicados	107	Dispositivo complejo, no indica interferentes
Matriz de Cd-Te Quantum dots	Estado gaseoso	2.6	Selectivo frente a 6 interferentes	108	Alta toxicidad
Aparición fluorescencia derivado Rodamina 6G	Estado gaseoso y disuelto en agua	0.8	Selectivo frente a 20 interferentes	109	Método comparable

**Tabla 2.** Comparación de distintos sensores y quimiodosímetros para la detección de formaldehído.

A modo de ejemplo y centrándonos en la utilización de un BODIPY para la detección de formaldehído, en 2012, Yoon *et al*<sup>101</sup>. presentaron un dosímetro basado en un núcleo de BODIPY para la detección de formaldehído en disolución. Este consiste en un núcleo de BODIPY funcionalizado con un grupo anilina en la posición *meso*, que origina una desactivación inicial de la fluorescencia por PET debido a la presencia del grupo amino. Tras reaccionar con formaldehído, la formación de la imina provoca una reorganización de los niveles energéticos de la molécula, impidiendo el PET y regenerando la fluorescencia del dosímetro (figura 18).





**Figura 18.** Dosímetro para la detección de formaldehído en disolución desarrollado por Yoon et al. Imagen extraída del trabajo publicado en “*Tetrahedron Lett.* **2012**, 53, 4913-4916” con permiso de la editorial.

Sin embargo, el número de sensores cromo o fluorogénicos para la detección de formaldehído en aire es más limitado. En 2016 Wu et al.<sup>108</sup> describieron el uso de una matriz de sensores colorimétricos para la detección de trazas de formaldehído en aire. Gou et al.<sup>106</sup> describieron en 2018 el uso del 4-amino-3-hidrazina-5-mercapto-1,2,4-triazol para la detección de formaldehído en aire. De nuevo en 2018, Wei et al.<sup>110</sup> describieron el uso de un sensor para la detección de formaldehído basado en el efecto de emisión inducida por agregación (AIE, por sus siglas en inglés). A la vista de los últimos trabajos mencionados podemos decir que la detección de formaldehído en aire es un campo de gran interés.



## **Capítulo 2: Objetivos.**



Los objetivos propuestos para el desarrollo de la presente tesis doctoral se pueden resumir y organizar en los siguientes puntos:

- Diseño de diversos quimiosensores y/o quimiodosímetros ópticos para la detección de formaldehído atendiendo tanto a la experiencia previa del grupo de investigación como a los ejemplos descritos en la bibliografía, empleando distintos métodos de transducción con el objetivo de explorar las distintas aproximaciones empleadas en la actualidad. Entre ellas, hacer uso de nanopartículas de oro y funcionalizarlas con distintos ligandos para explorar diversos métodos de reconocimiento de formaldehído o desarrollar un *cassette* de transferencia energética a través de enlace (TBET) como método de detección de formaldehído.

- Síntesis y caracterización de los sensores y/o dosímetros previamente diseñados, a través de los métodos habituales de química orgánica y ciencia de materiales, así como estudio de sus características espectroscópicas.

- Evaluación del comportamiento de los dosímetros obtenidos frente a formaldehído, evaluando primero su efectividad para la detección de formaldehído en solución acuosa (formalina) para posteriormente extender el estudio a la detección de formaldehído en aire. Así mismo se ensayará la utilización de diversos soportes sólidos para la inmovilización del dosímetro.



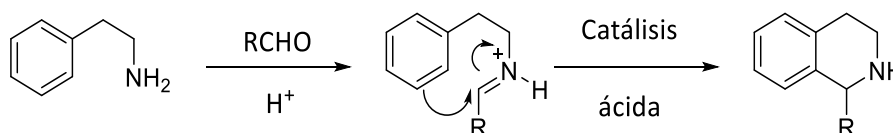
# **Capítulo 3: Dosímetro químico basado en dopamina para la detección de formaldehído.**





### 3.1 Introducción

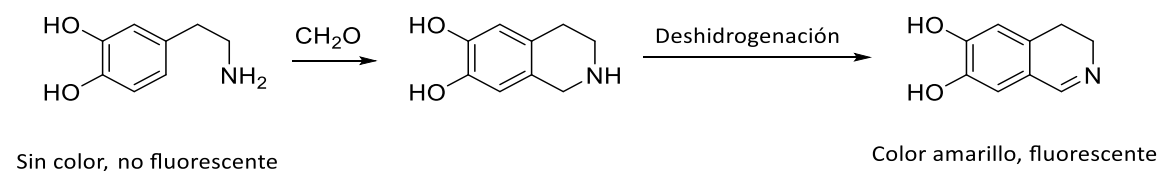
La primera aproximación explorada fue la utilización de la reacción de Pictet-Spengler como método de reconocimiento de formaldehído. Esta reacción fue descubierta en 1911 por A.Pictet y T.Spengler<sup>111</sup> y consiste en la condensación entre una  $\beta$ -arilamina y un aldehído o cetona para dar la correspondiente imina, seguida de una ciclación 6-endo-trig. Por último, una etapa de desprotonación regenera la aromaticidad del anillo y da lugar a la correspondiente tetrahydroisoquinolina (esquema 9). Debido a la utilidad de esta reacción, la encontramos ampliamente extendida tanto en la naturaleza como en la química orgánica<sup>112</sup>.



**Esquema 9.** Etapas de la reacción de Pictet-Spengler.

Aunque esta reacción proporciona un método de reconocimiento de formaldehído, las correspondientes tetrahydroisoquinolinas generadas no presentan unas propiedades ópticas reseñables. Sin embargo, la adición de una etapa de deshidrogenación adicional da lugar a dihydroisoquinolinas que en muchos casos exhiben propiedades fluorescentes. Tanto es así, que esta metodología (reacción de catecolaminas primarias con formaldehído seguida de un proceso de oxidación aeróbica obteniendo dihydroisoquinolinas fluorescentes) ha sido ampliamente utilizada en el campo de la bioquímica para la detección histoquímica de monoaminas biógenas mediante microscopia de fluorescencia<sup>113</sup>.

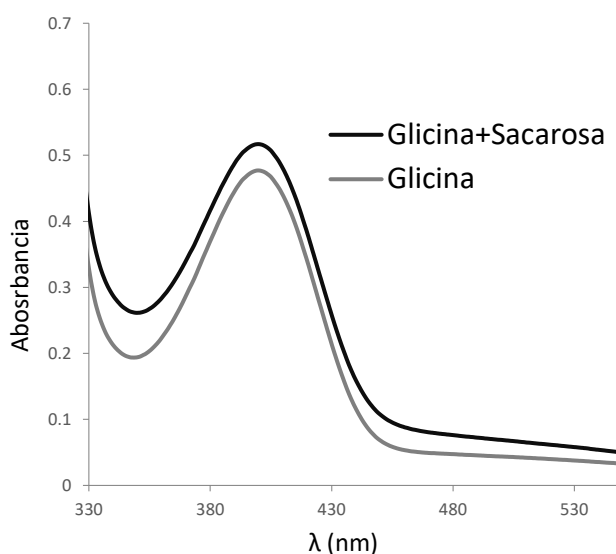
En el presente trabajo se describe el uso de esta metodología, pero para la detección de formaldehído. El protocolo de reconocimiento se describe en el esquema 10.



**Esquema 10.** Detección cromo-fluorogénica de formaldehído con dopamina mediante la reacción de Pictet-Spengler.

## 3.2 Resultados y discusión

Aunque el objetivo final del presente trabajo era desarrollar un dosímetro capaz de detectar formaldehído en aire, los primeros experimentos se realizaron con formaldehído en disolución para estudiar el funcionamiento del dosímetro y optimizar tanto la reacción como las condiciones de medida. Para llevar a cabo la etapa de deshidrogenación final y obtener la dihidroisoquinolina correspondiente se decidió estudiar la efectividad de la mezcla de glicina y sacarosa empleada en el trabajo original descrito por Bjorklund *et al.*<sup>114</sup>. Con el objetivo de determinar si ambos componentes eran necesarios para obtener una respuesta frente al analito, se hizo reaccionar dopamina ( $10^{-3}$  M) en presencia de glicina (0.1 equivalentes) o de la mezcla glicina-sacarosa (0.1-0.06 equivalentes) con formaldehído (60 mM) y se registró el espectro de UV-visible de ambas disoluciones (gráfica 1).

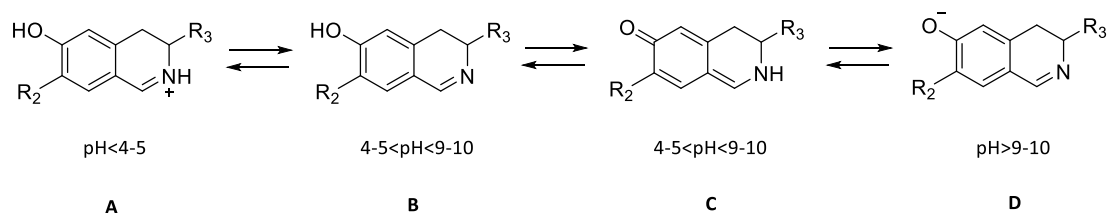


**Gráfica 1.** Influencia de la glicina y la sacarosa en la respuesta UV-visible de la dopamina frente a formaldehído.

A la vista de los resultados obtenidos y teniendo en cuenta que las mezclas de dopamina más formaldehído son incoloras y no presentan ninguna banda en el rango estudiado, se observó que la presencia de glicina era necesaria para que se produjera una respuesta colorimétrica. Respecto al uso de sacarosa, su presencia no es

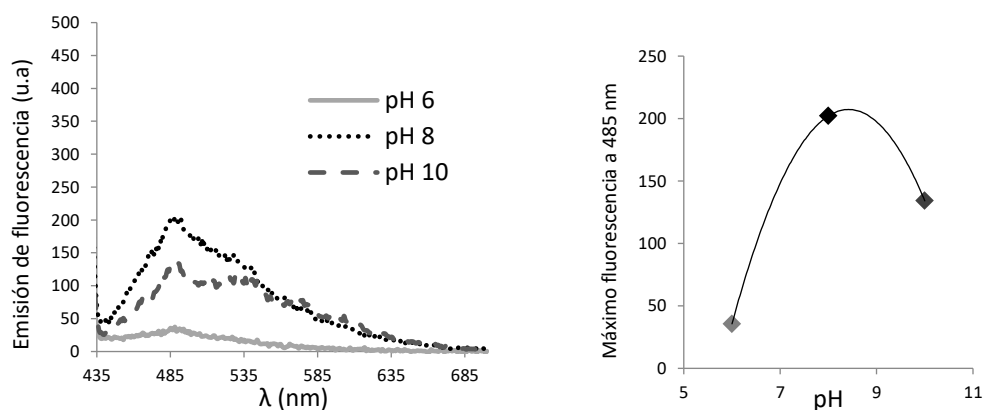
estrictamente necesaria para que se produzca la reacción y por tanto el proceso de detección, sin embargo, aumenta ligeramente la respuesta óptica del dosímetro.

De igual modo, debido a que la forma cetónica **C** de la dihidroisoquinolina parece ser la responsable de la fluorescencia (esquema 11), existe una dependencia entre la respuesta óptica del dosímetro y el pH del medio, ya que éste influye en el desplazamiento del equilibrio hacia una u otra estructura.



**Esquema 11.** Rango de pH y predominio de estructuras de la 6-hidroxi-3,4-dihidroisoquinolina.

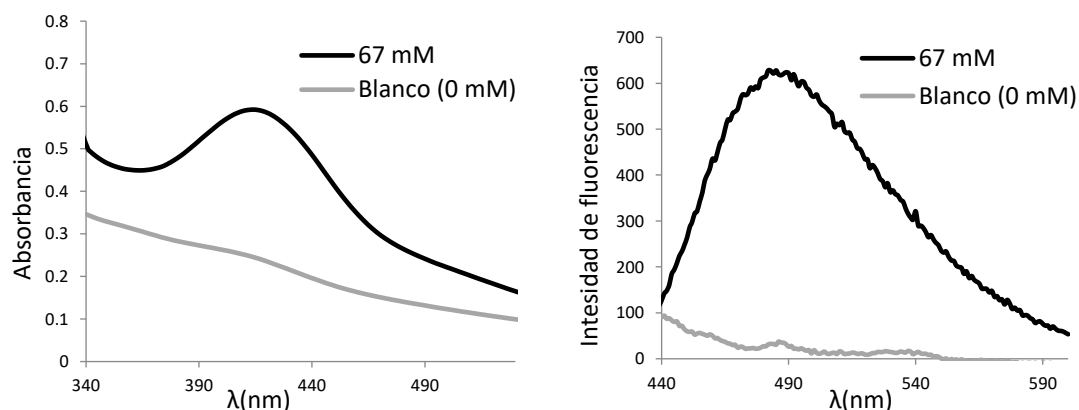
Por tanto, para confirmar dicho efecto y obtener las mejores condiciones de medida, se decidió realizar un experimento disolviendo el dosímetro ( $10^{-3}$  M en dopamina, 0.1 equiv. glicina, 0.06 equiv. sacarosa) en tres medios distintos (tampón fosfato pH 6 y 8 y tampón carbonato pH 10)<sup>113</sup> y se hizo reaccionar con formaldehído (10 mM, gráfica 2). Como puede observarse en la gráfica 2, la representación del máximo de fluorescencia para cada pH describe una curva con el máximo centrado a pH 8 aproximadamente.



**Gráfica 2.** Influencia del pH en la emisión de fluorescencia del dosímetro ( $10^{-3}$  M) en distintos medios (tampón fosfato pH 6 y 8 y tampón carbonato pH 10) tras la reacción con formaldehído (10 mM). Slit excitación: 5, slit emisión: 5,  $\lambda_{exc}=420$  nm.

Una vez establecidas las condiciones óptimas para el sistema, se preparó el quimiodosímetro correspondiente que consistió en una disolución acuosa  $10^{-3}$  M de dopamina a pH 8 (tampón fosfato 0.01M), conteniendo 0.1 equivalentes de glicina y 0.06 equivalentes de sacarosa respecto a la dopamina.

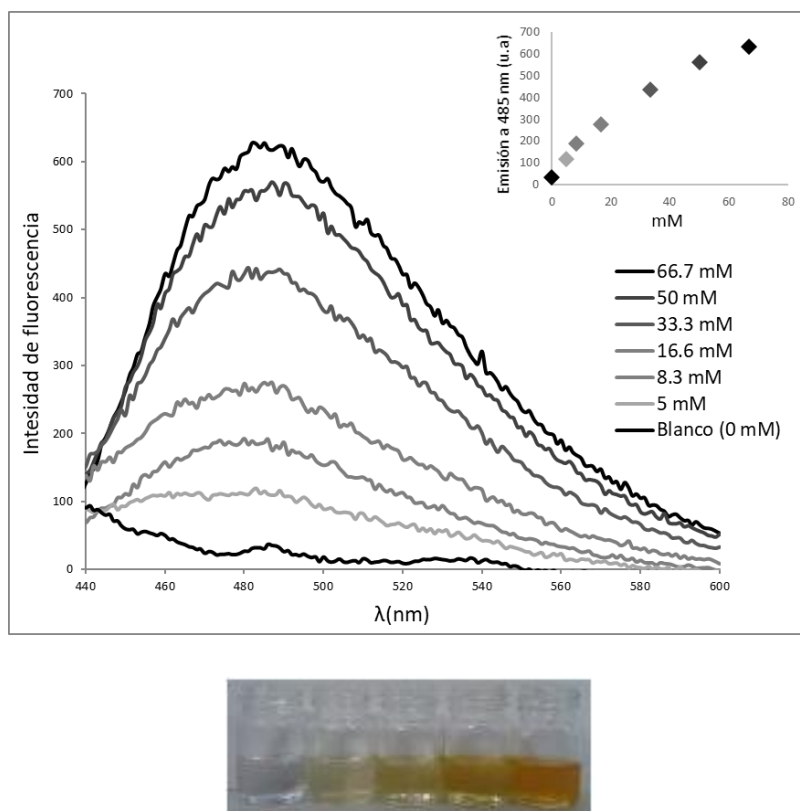
Al añadir un exceso de formaldehído acuoso (67 mM) al dosímetro, y tras un periodo de reacción aproximado de 3 minutos a temperatura ambiente, se observó la aparición progresiva de una coloración amarilla en la disolución, que se correspondía con la aparición de una nueva banda de absorción con un máximo centrado a 410 nm en el espectro UV-visible (gráfica 3). Por otro lado, también se observaron cambios importantes en las propiedades fluorescentes del dosímetro, apareciendo una banda de emisión fluorescente centrada a 485 nm cuando se irradió la mezcla con una longitud de onda de excitación de 420 nm (gráfica 3).



**Gráfica 3.** (A) Espectro UV-visible del dosímetro ( $10^{-3}$  M en tampón fosfato 0.01 M pH = 8) antes (blanco) y después de la adición de formaldehído (67 mM). (B) Espectro de emisión de fluorescencia del dosímetro antes (blanco) y después de la adición de formaldehído (67 mM,  $\lambda_{em}=485$  nm,  $\lambda_{exc}=420$  nm).

Los cambios observados en ambos espectros pusieron de manifiesto que en presencia de formaldehído se producía tanto la reacción de Pictet-Spengler como la posterior etapa de deshidrogenación como se muestra en el esquema 10.

Una vez comprobada la capacidad del dosímetro para reaccionar con exceso de formalina y producir cambios medibles en sus propiedades ópticas, se pasó a determinar la concentración mínima de formaldehído que era capaz de detectar. Para ello, se registró el espectro de fluorescencia del dosímetro tras reaccionar con cantidades decrecientes de formaldehído (desde 67 hasta 0.5 mM) durante un periodo de 15 minutos (figura 19).



**Figura 19.** (Arriba) Espectros de fluorescencia del dosímetro ( $10^{-3}$  M en tampón fosfato a pH = 8) en presencia de cantidades decrecientes de formaldehído. Gráfica insertada: Representación del máximo de fluorescencia a 485 nm frente a la concentración de formaldehído. (Abajo) Cambios de color observados bajo las mismas condiciones (de izquierda a derecha 0, 5, 16.6, 66.7 y 150 mM). Slit excitación: 5, slit emisión: 5,  $\lambda_{exc}$  = 420 nm.

En estos experimentos, se observó que concentraciones de formaldehído superiores a 80 mM, producían la aparición de turbidez en la disolución lo que sugería la presencia de un precipitado.

Con los datos obtenidos, y representando la intensidad de emisión a 485 nm frente a la concentración de formaldehído se calculó el límite de detección (LdD) empleando la ecuación 1:

$$LdD = \frac{3 \cdot S_{b1}}{S}$$

**Ecuación 1.** Fórmula utilizada para el cálculo del límite de detección.

Donde  $S_{b1}$  es la desviación estándar del blanco y  $S$  es la pendiente de la gráfica del máximo de fluorescencia a 485 nm frente a la concentración de formaldehído. Utilizando esta fórmula, el LdD obtenido fue de 0.24 mM.

Como hemos descrito en apartados anteriores, debido a la alta solubilidad del formaldehído en agua, podemos encontrar disoluciones de este compuesto en muchos entornos, sin embargo, como el formaldehído es un gas a temperatura ambiente, no permanece por largos periodos en disolución y por ello, no se suelen llevar a cabo detecciones de formaldehído en medios acuosos. Por esta razón, se decidió continuar con el desarrollo del dosímetro y ampliar su campo de acción, tratando de llevar a cabo la detección de formaldehído en aire. Con este fin, se prepararon tiras reactivas de gel de sílice con el dosímetro adsorbido, con objeto de realizar una detección colorimétrica de dicho gas a simple vista.

Para realizar los experimentos de detección, se expusieron las tiras reactivas a vapores de formaldehído durante 30 minutos. Para establecer una concentración determinada de formaldehído, se añadieron concentraciones variables de formalina en distintos matraces cerrados y utilizando la ley de Henry<sup>115</sup> se calculó la concentración de formalina necesaria para, una vez alcanzado el equilibrio liquido-gas, obtener una determinada concentración de formaldehído en aire (desde 0 a 50 ppm). Mientras el blanco (dosímetro adsorbido en ausencia de este gas) utilizado como control mostraba unos cambios de color despreciables durante los experimentos, las tiras reactivas con el dosímetro adsorbido exhibían un cambio cromogénico de blanco a amarillo observable a simple vista (figura 20).

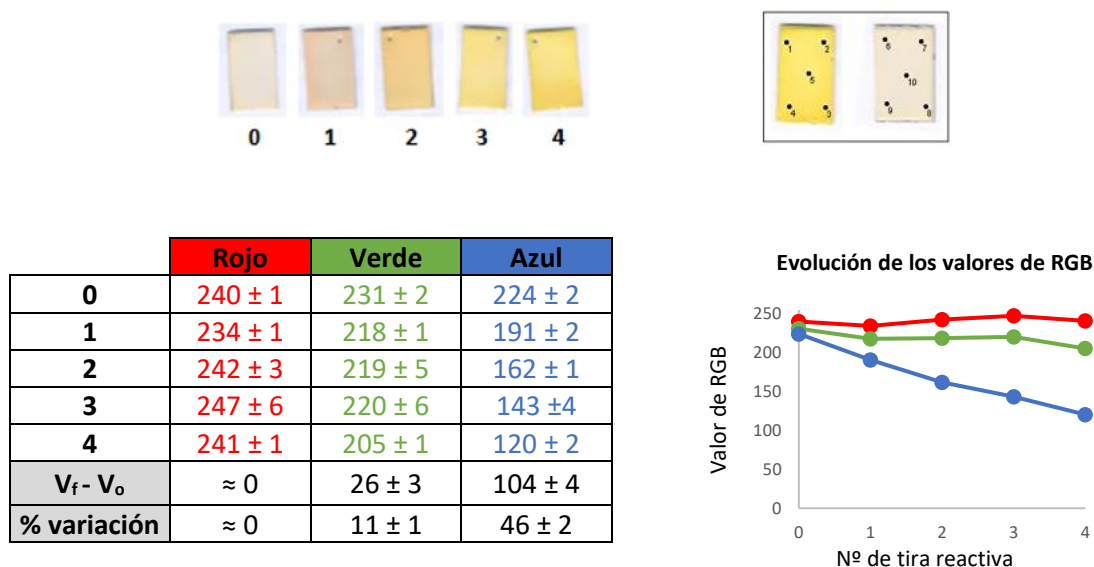




**Figura 20.** Dosímetro soportado sobre gel de sílice en presencia de cantidades decrecientes de formaldehído durante 30 minutos (de izquierda a derecha 0, 40, 16 y 8 ppm de formaldehído).

Tras comprobar la efectividad del sistema para la detección de formaldehído en aire, pasamos a determinar la concentración mínima de formaldehído gas que se podía detectar con este sistema. Con el objetivo de establecer un método de cuantificación de la respuesta colorimétrica observada, se decidió escanear las tiras reactivas para obtener imágenes digitales de dichas tiras y determinar sus coordenadas RGB (rojo, verde y azul, por sus siglas en inglés) utilizando un programa de tratamiento de imagen (ImageJ).

El modelo de color RGB es una de las múltiples formas actuales para representar un color y está basado en la combinación de los tres colores de luz primarios (rojo, verde y azul) para conseguir un amplio rango de colores. Por tanto, mediante este método podemos deconvolucionar cualquier color en sus tres componentes primarios y cuantificarlos. Con el objetivo de extender esta técnica a nuestro estudio, se suspendieron las tiras reactivas en varios matraces cerrados conteniendo cantidades crecientes de formaldehído (generado a partir del equilibrio líquido-gas de la formalina). Tras finalizar el tiempo de contacto con el gas, se escanearon las tiras reactivas para conseguir una imagen digital y poder realizar un análisis de las coordenadas RGB obtenidas (figura 21).

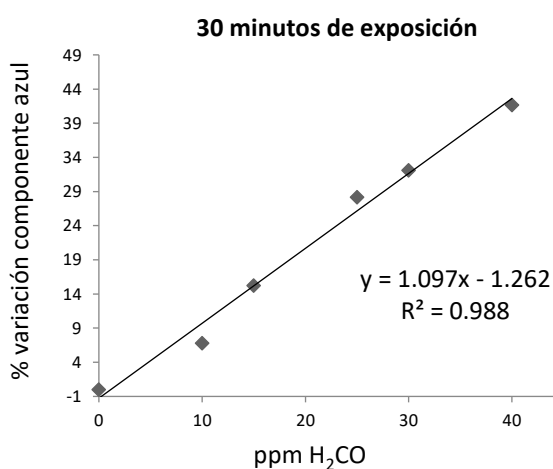


**Figura 21.** Análisis de las coordenadas RGB de las tiras reactivas tras reaccionar con formaldehído.

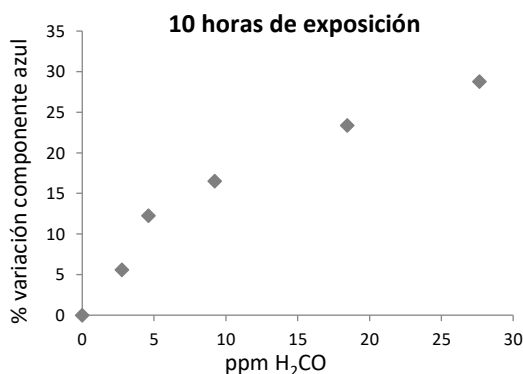
Como se observa en la figura 21, la tira reactiva **0** se utilizó como blanco, mientras que las tiras reactivas **1** a **4** se expusieron a concentraciones crecientes de formaldehído. Tras obtener las coordenadas RGB de cada tira reactiva y representarlas, se observó que el aumento del color amarillo asociado a la reacción con formaldehído podía relacionarse con una disminución en la coordenada azul (46% aproximadamente respecto al blanco), mientras que la coordenada roja permanecía prácticamente inalterada. También se observó una reducción entorno al 10% en la coordenada verde, sin embargo, se decidió no considerar dicha variación para no complicar en exceso el análisis matemático. Por tanto, utilizamos las variaciones de la coordenada azul para establecer una relación lineal entre su incremento y la concentración de formaldehído, permitiendo este procedimiento determinar el límite de detección del sistema.

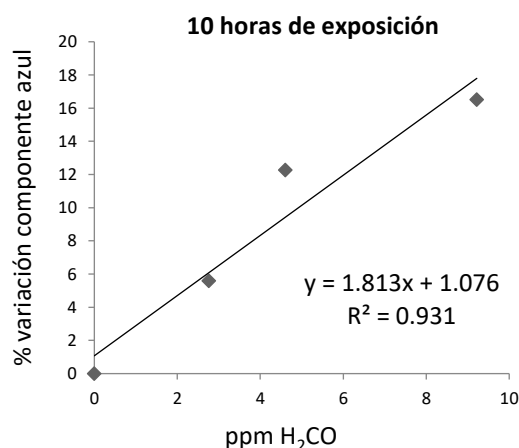
Desde el punto de vista de seguridad, los límites de exposición a formaldehído (*Permissible Exposure Limit*, PEL) están expresados de dos formas distintas: El límite para un periodo corto de exposición (*Short-Term Exposure Limit*, STEL), que representa la máxima concentración de formaldehído permitida para un periodo de exposición de 15 minutos y el límite para un periodo largo de exposición, establecido para un tiempo

medio de 8 horas. El “National Institute for Occupational Safety and Health” (NIOSH) establece unos límites de 2 y 1 ppm de formaldehído respectivamente para ambos periodos de exposición<sup>86</sup>. Por esta razón, los experimentos para determinar el límite de detección de nuestro dosímetro fueron diseñados para exponer las tiras reactivas a unas concentraciones de formaldehído gas determinadas durante periodos de tiempo de exposición de 30 minutos (gráfica 4) y 10 horas (gráfica 5), permitiéndonos conocer el comportamiento del dosímetro tanto a cortos como a largos periodos de exposición.



**Gráfica 4.** Porcentaje de variación de la componente azul frente a la concentración de formaldehído en aire tras 30 minutos de exposición.



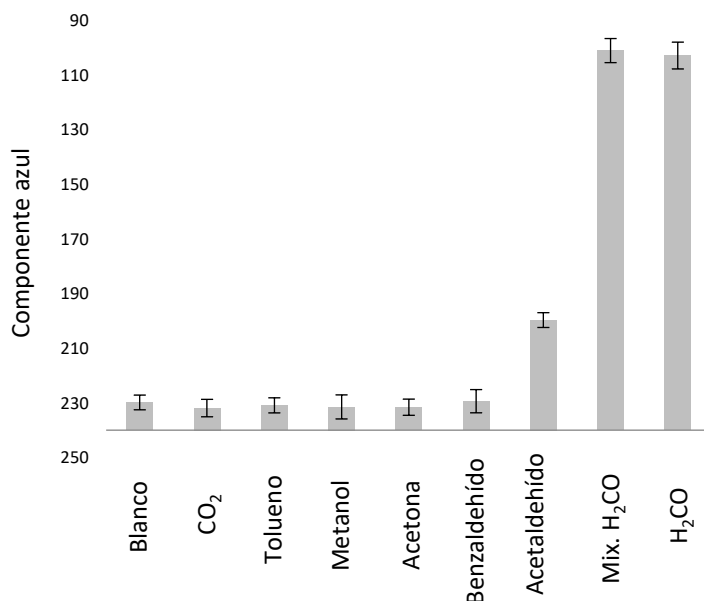


**Gráfica 5.** (Arriba) Porcentaje de variación de la componente azul frente a la concentración de formaldehído en aire tras 10 horas de exposición. (Abajo) Zona lineal de la recta de calibrado.

Los límites de detección obtenidos empleando la ecuación 1 fueron 0.7 ppm y 0.4 ppm para periodos de exposición de 30 min y 10 h respectivamente. La exposición de las tiras reactivas a concentraciones superiores a 40 ppm generaba una saturación de las mismas que impedía su empleo a esas concentraciones. Curiosamente, los límites de detección alcanzados en la detección de formaldehído en aire mejoraron el obtenido para la detección de formaldehído en disolución, probablemente debido a la degradación y/o reacciones de oxidación que sufre la dopamina en disolución acuosa que podría reducir o enmascarar la respuesta óptica debida a la reacción con formaldehído, aunque cabe decir que ambos métodos no son estrictamente comparables.

Un aspecto importante en el desarrollo de todo sensor es el estudio de interferentes. Por ello, una vez demostrada la efectividad del quimiodosímetro en la detección de formaldehído en aire, para evaluar la selectividad del sistema, se le expuso durante 30 minutos a concentraciones elevadas de vapores de distintos compuestos orgánicos volátiles (metanol, acetona, tolueno, acetaldehído, benzaldehído, dióxido de carbono, formaldehído y una mezcla de ellos). Como puede observarse en la gráfica 6, solamente las mezclas que contenían formaldehído (sólo o

mezclado con vapores de todos los interferentes) mostraron una respuesta visual observable.



**Gráfica 6.** Respuesta del dosímetro frente a varios interferentes. Dióxido de carbono (10.000 ppm), benzaldehído (12.000 ppm), acetaldehído (195.000 ppm), metanol (270.000 ppm), acetona (149.000 ppm), tolueno (200.000 ppm) y formaldehído (3.500 ppm) y mezcla de formaldehído y todos los interferentes.

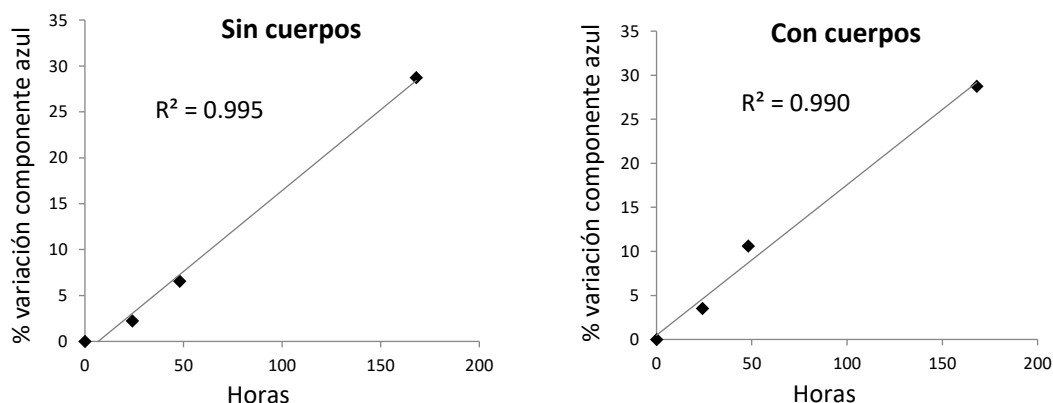
Tras comprobar la selectividad del dosímetro frente a formaldehído, se decidió ampliar el estudio y llevar a cabo la detección y/o monitorización de formaldehído en ambientes más realistas. Para ello, se colocaron diversas tiras reactivas en la sala de disección de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia en dos semanas diferentes (en presencia y ausencia de cuerpos preservados previamente en formalina), así como en una zona libre de formaldehído (para ser usadas como blanco) y se recogieron dichas tiras a dos tiempos distintos, 24 y 48 horas después de su colocación de acuerdo con la disponibilidad de la sala (figura 22).



**Figura 22.** Soportes utilizados en la sala de disección de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia tras 48 horas de exposición. (Izquierda) Blanco situado en un espacio sin presencia de formaldehído. (Derecha) Soporte situado en la sala de disección.

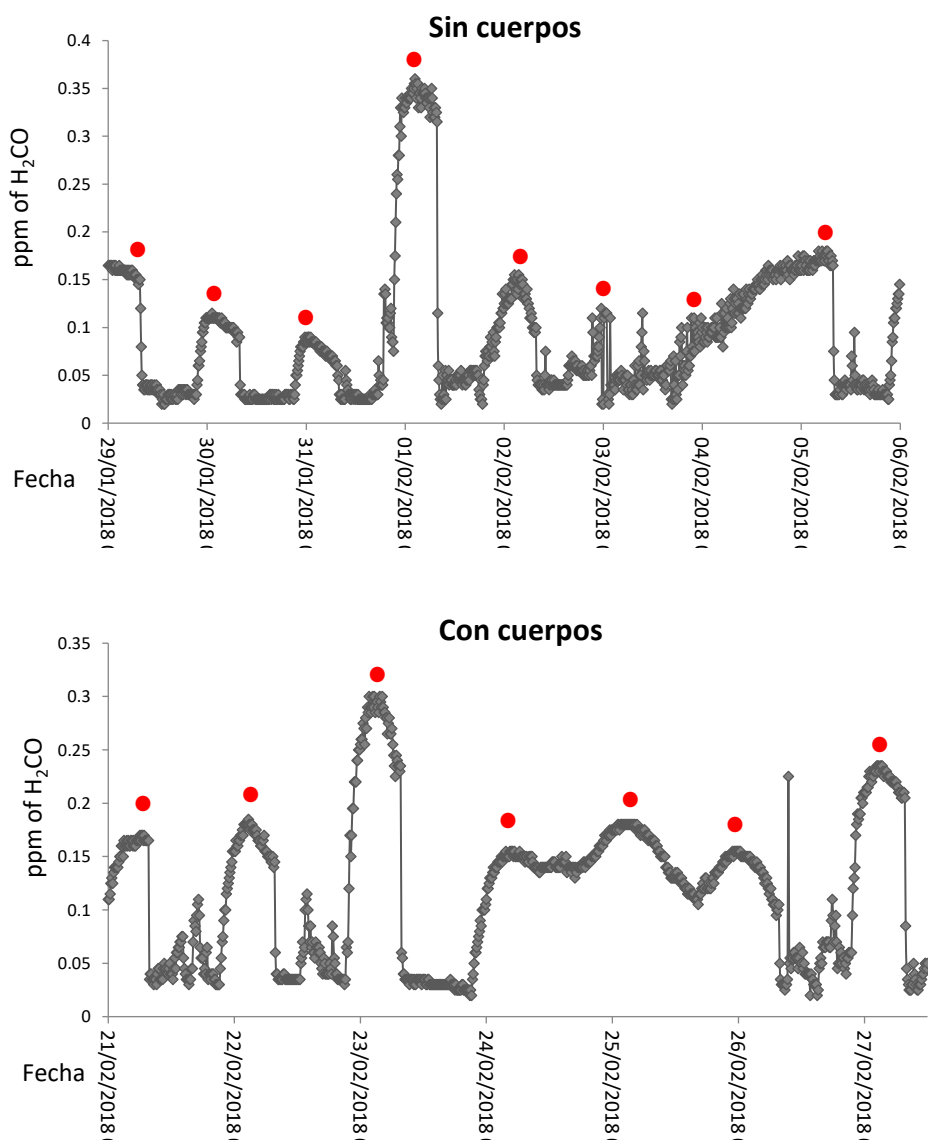
Después de recoger las tiras reactivas expuestas a formaldehído en la sala de disección y los blancos y analizar los resultados mediante la metodología descrita anteriormente, se observaron cambios de color asociados a la presencia de formaldehído en ambas semanas, siendo más intensos en el periodo de tiempo donde estaban los cuerpos presentes. Además, los cambios de color tras 48 horas de exposición a los cuerpos eran perfectamente visibles por el ojo humano. En todos los casos se determinó el porcentaje de variación de la componente azul con respecto al blanco con el objetivo de compensar el posible envejecimiento de las tiras reactivas a causa del tiempo y se observó que dicho porcentaje de variación mantenía una relación lineal con el tiempo (gráfica 7).

Tiempo (horas)	% Variación sin cuerpos	% Variación con cuerpos
24	$2 \pm 1$	$3 \pm 1$
48	$7 \pm 2$	$10 \pm 2$



**Gráfica 7.** (Arriba) Porcentaje de variación de la componente azul respecto al blanco de las tiras reactivas situadas en la sala de disección de la Facultad de Medicina en presencia y ausencia de cuerpos. (Abajo) Representación de los valores anteriores para 24 y 48 horas, así como el valor obtenido para las 168 horas.

Para evaluar la validez y poder comparar los resultados obtenidos, se utilizaron los datos recogidos por un sensor externo (*Board IFB*) específico para formaldehído situado también en la sala de disección. En concreto, se calculó el valor medio de los valores máximos registrados a lo largo del periodo de estudio (los puntos rojos en la gráfica 8).



**Gráfica 8.** Registro de la concentración de formaldehído (en ppm) medida por el sensor externo (*Board IFB*) en ausencia y presencia de cuerpos durante el periodo de estudio.

Mediante este protocolo, se estimó una concentración media de formaldehído de 0.12 ppm aproximadamente en ausencia de cuerpos y de 0.18 en presencia de estos. Estos valores indican una variación del 50% en la concentración media de formaldehído, lo que concuerda adecuadamente con el valor obtenido mediante nuestro sistema (46%). Este hecho nos permite sentar las bases para desarrollo de un quimiodosímetro personal, barato y selectivo.



### 3.3 Conclusiones

Como conclusión del presente capítulo se puede indicar que se ha preparado un dosímetro capaz de reconocer formaldehído tanto en disolución acuosa como en aire. Los componentes de éste (dopamina, glicina y sacarosa) son baratos y respetuosos con el medio ambiente si los comparamos con la mayoría de los reactivos usados en los sensores moleculares ópticos descritos en la introducción. En disolución pueden utilizarse tanto el cambio de color como la emisión de fluorescencia para la detección de formaldehído. La respuesta del dosímetro soportado sobre gel de sílice es colorimétrica e incluso puede seguirse a simple vista. Los límites de detección alcanzados para periodos de exposición a formaldehído gas largos y cortos han sido 0.4 y 0.7 ppm respectivamente, obtenidos mediante un sencillo programa de tratamiento de imagen. Finalmente, se realizaron pruebas de detección de formaldehído gas bajo condiciones reales, en la sala de disección de la Facultad de Medicina obteniéndose unos resultados aceptables.

## 3.4 Parte experimental

### Procedimientos generales

Todos los reactivos utilizados están disponibles comercialmente y fueron usados sin una purificación previa. Para las tiras reactivas se utilizó gel de sílice 60 F<sub>254</sub> (Merck). Los espectros de UV-vis se registraron con un espectrofotómetro Shimadzu UV-2101PC utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm de longitud y los espectros de fluorescencia se registraron mediante un fluorímetro Varían Cary Eclipse.

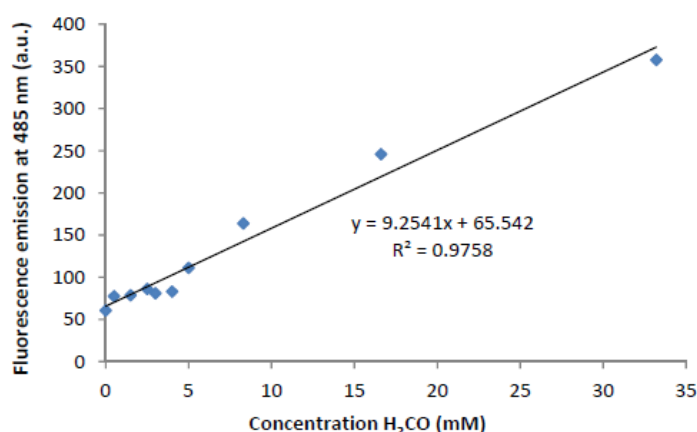
### Optimización del quimiodosímetro y de las condiciones de medida

Por una parte, se prepararon dos disoluciones acuosas distintas, una con dopamina ( $10^{-3}$  M) y glicina (0.1 eq.) y otra con dopamina ( $10^{-3}$  M), glicina (0.1 eq.) y sacarosa (0.06 eq.) y se hicieron reaccionar ambas con formaldehído acuoso (60 mM) a temperatura ambiente. Tras esperar 5 minutos se registraron los espectros de UV-visible. Por otra parte, se preparó el dosímetro (dopamina  $10^{-3}$  M, 0.1 eq. de glicina y 0.06 eq. de sacarosa) en tres medios distintos (tampón fosfato 0.01 M pH 6 y 8 y tampón carbonato 0.01 M pH 10) y las disoluciones resultantes se hicieron reaccionar con formaldehído acuoso (10 mM). Tras esperar 5 minutos se registraron los correspondientes espectros de fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 420$  nm).

### Determinación del límite de detección del dosímetro para formaldehído en disolución

Para determinar el límite de detección se añadieron diferentes alícuotas de formaldehído (35% o disoluciones diluidas) a 3 mL del dosímetro ( $10^{-3}$  M en dopamina, tampón fosfato pH 8, 0.1 equiv. glicina, 0.06 equiv. sacarosa), alcanzando una

concentración final de formaldehído entre 1 y 70 mM. Tras un tiempo de reacción de 15 minutos, se registraron los correspondientes espectros de fluorescencia. El límite de detección se obtuvo a partir de la gráfica de la intensidad de fluorescencia a 485 nm frente a la concentración de formaldehído, expresada en mM (gráfica 9) y la ecuación 1 resultando ser de 0.24 mM.



**Gráfica 9.** Representación del máximo de fluorescencia a 485 nm frente a la concentración de formaldehído (en mM).

### Preparación de las tiras reactivas

Las tiras reactivas utilizadas para la detección de formaldehído en aire fueron preparadas sumergiendo placas de sílice (1 cm x 1 cm) durante un segundo en una disolución acuosa  $10^{-1}$  M de dopamina (tampón fosfato pH 6) que contenía también glicina (0.1 equivalentes) y sacarosa (0.06 equivalentes). A continuación, se dejaron secar las placas de sílice al aire durante 45 minutos y se repitió el proceso una vez más.

### **Determinación del límite de detección de formaldehído en aire mediante análisis de las coordenadas RGB**

Los experimentos para determinar el límite de detección del sistema se llevaron a cabo suspendiendo las tiras reactivas en matraces de fondo redondo de 250 mL, que contenían 20 mL de formalina a distintas concentraciones. Los experimentos fueron realizados a 25°C.

$$P(atm) = \frac{Concentration(M)}{H_{eff}(M \cdot atm^{-1})} \quad (2)$$

$$ppm = P(atm) \cdot 10^6 \quad (3)$$

Utilizando la ley de Henry<sup>115</sup> y una  $H_{eff} = 3700 \text{ M atm}^{-1}$  se calculó la concentración de formalina necesaria para, una vez alcanzado el equilibrio liquido-gas, obtener una determinada concentración de formaldehído en aire (desde 0 a 50 ppm). Una vez realizados los experimentos, el límite de detección se obtuvo de la gráfica del porcentaje de variación de la componente azul respecto al blanco (del análisis de RGB) frente a la concentración de formaldehído (en ppm). El valor se calculó utilizando la misma ecuación empleada en el cálculo en disolución, donde  $S_b$  (0.26) es la desviación estándar del porcentaje de variación del blanco (5 réplicas) y  $S$  es la pendiente de la recta de calibrado.

Para extraer los datos, se escanearon las tiras reactivas para obtener las imágenes digitales y determinar su coordenada azul utilizando un programa de tratamiento de imagen (ImageJ). En cada tira reactiva se seleccionaron cinco puntos distintos para obtener el valor medio de la coordenada azul. A continuación, se calculó el porcentaje de variación de dicha coordenada respecto al blanco para cada concentración de formaldehído. De igual modo, para las medidas realizadas a tiempos largos en la facultad de Medicina, el porcentaje de variación de la componente azul para

cada tira se calculó respecto su propio blanco (24 y 48 horas), para así compensar los posibles cambios de color asociados al envejecimiento de las tiras reactivas.

### **Estudio de interferentes**

Para llevar a cabo los experimentos con interferentes, se expusieron las tiras reactivas a vapores de metanol, acetona, tolueno, acetaldehído, benzaldehído, dióxido de carbono, formaldehído y una mezcla de ellos. En cada caso, se depositaron 100  $\mu\text{L}$  de cada interferente en matraces de fondo redondo de 250 mL, suspendiendo las tiras reactivas en el centro. Se cerró el sistema y se calentó a 60°C durante 30 minutos.

### **Detección de formaldehído en ambientes reales**

Los experimentos de detección de formaldehído en ambientes reales se llevaron a cabo en la sala de disección de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia. Las tiras reactivas se introdujeron por triplicado en un soporte para facilitar su transporte y fueron depositadas en el centro de la sala en dos semanas distintas, la primera en ausencia de cuerpos y la segunda en presencia de cuerpos (preservados en formalina). Estos soportes fueron retirados a las 24 y 48 horas (debido a la disponibilidad de la sala de disección) con el objetivo de analizar los cambios de color con el tiempo.



## **Capítulo 4. Aproximación al uso de sistemas *cassette* de transferencia de energía basados en BODIPY para la detección de formaldehído.**





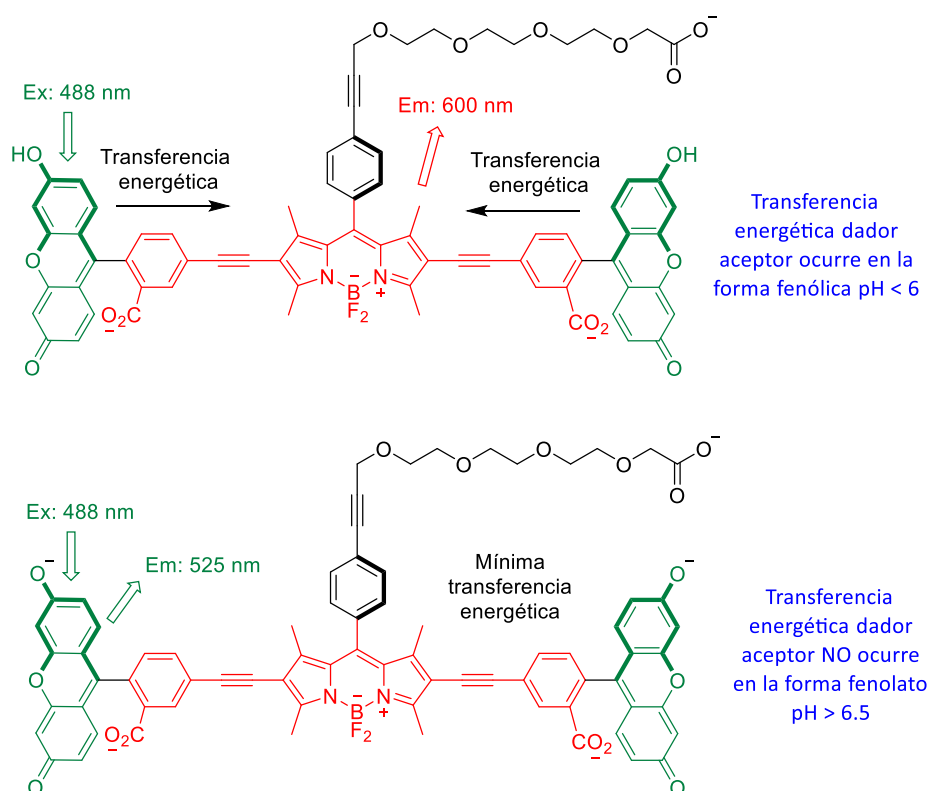
## 4.1 Introducción

En el capítulo anterior se ha abordado el estudio del uso de dopamina como dosímetro químico para la detección de formaldehído mediante una modificación de la conocida reacción de Pictet-Spengler. Esta reacción da lugar a la correspondiente dihidroisoquinolina que exhibe propiedades ópticas distintas a las del compuesto inicial.

Como se ha descrito en la introducción, el uso de sistemas con un único cromóforo o fluoróforo pueden presentar limitaciones en ciertas aplicaciones. Por ello, en el presente capítulo se presentan los trabajos llevados a cabo para estudiar la posibilidad de utilizar un dosímetro químico multifluoróforo con estructuras tipo dador-aceptor o “cassettes de transferencia de energía” para la detección de formaldehído.

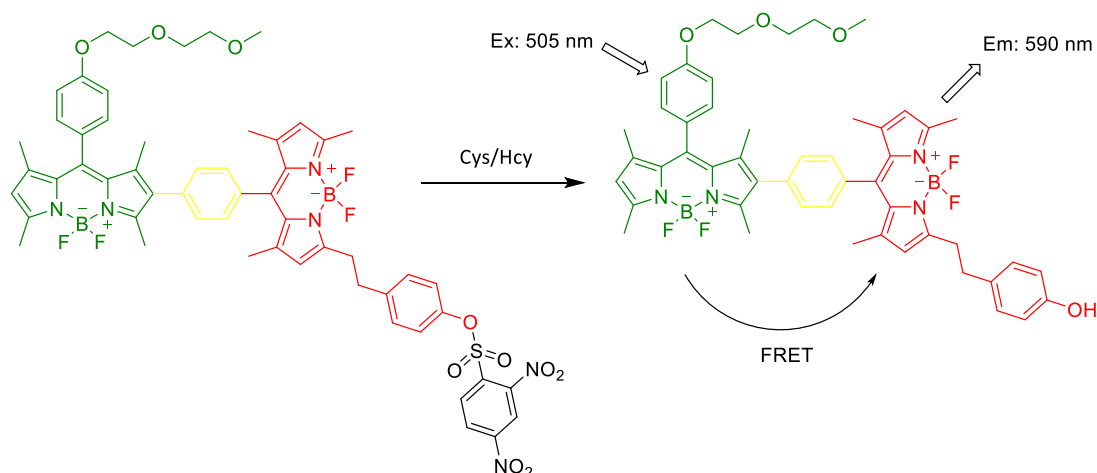
En la bibliografía existen diversos ejemplos donde se describe el uso de sistemas multifluoróforos para distintas aplicaciones. Así, K. Burgess *et al*<sup>116</sup>, describieron en 2009 el uso de un sistema multifluoróforo como sensor de pH (figura 23). La forma fenólica de la fluoresceína actúa como unidad dadora produciendo una transferencia energética a través de enlace (TBET) hacia el cuerpo del BODIPY, que actúa como unidad aceptora. Sin embargo, este fenómeno no se observa cuando el pH del medio genera el fenolato de la fluoresceína, dando lugar a propiedades ópticas distintas en función del pH del medio.

#### Capítulo 4. Aproximación al uso de sistemas *cassette* de transferencia de energía basados en BODIPY para la detección de formaldehído



**Figura 23.** Diseño del sensor de pH desarrollado por K. Burgess et al. Imagen extraída del trabajo publicado en “*J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1642–1643” con permiso de la editorial.

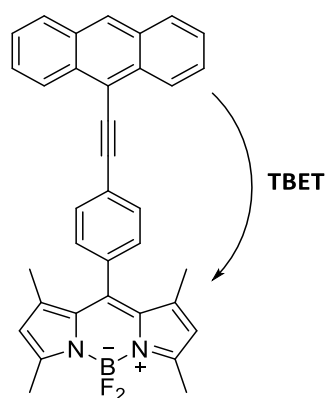
Por otro lado, J. Zhao, T. D. James *et al*<sup>53</sup> publicaron en 2012 un dosímetro, basado en el fenómeno FRET (transferencia de energía de resonancia de Förster) para la detección de cisteína y homocisteína. El dosímetro consiste en dos unidades de BODIPY conectadas mediante un anillo de benceno entre las cuales no existe una transferencia energética inicial (figura 24). Los grupos tiol del analito producen la ruptura del grupo 2,4-dinitrobenzenosulfonilo presente en uno de los BODIPY regenerando el grupo fenol y permitiendo así la transferencia energética entre ambas unidades.



**Figura 24.** Diseño del sensor de cisteína y homocisteína desarrollado por J. Zhao, T. D. James et al. Imagen extraída del trabajo publicado en “*Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 29-43” con permiso de la editorial.

Atendiendo a la experiencia adquirida previamente en el uso de derivados de dopamina como sustratos para la detección de formaldehído, se decidió combinar el uso de estas unidades con un BODIPY para llevar a cabo la detección de formaldehído mediante un proceso de transferencia energética a través de enlace.

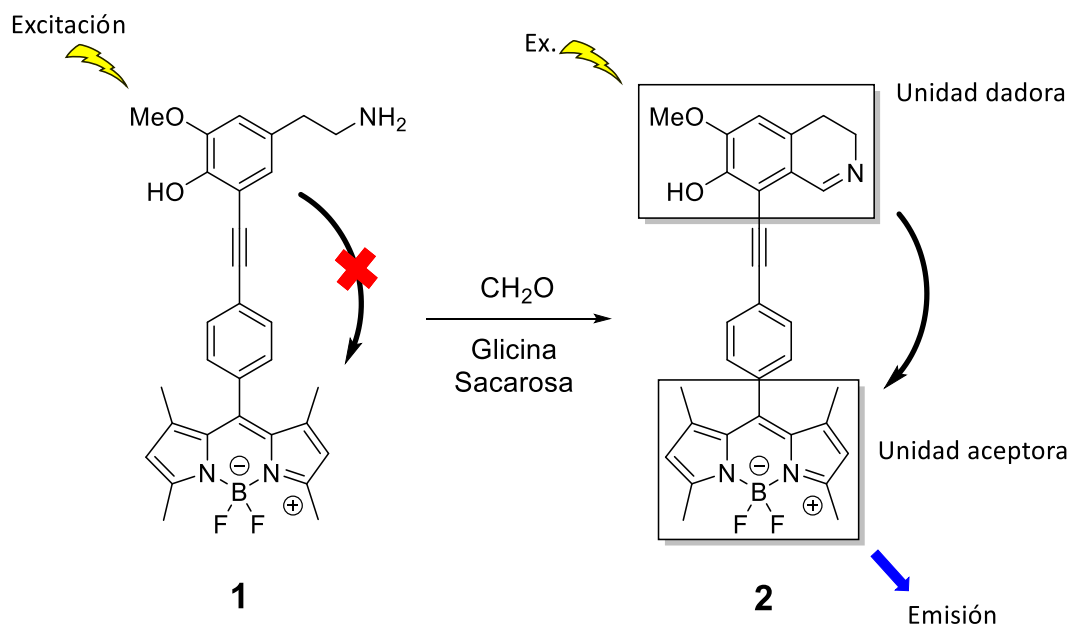
La elección del espaciador se realizó considerando una de las restricciones existentes en este tipo de sistemas que establece que debe introducirse un giro en la estructura para que la unidad dadora y aceptora no se dispongan de manera coplanar ya que, de no ser así, se comportarían como una única unidad conjugada. Para conseguir este tipo de estructura se siguió la idea de Burgess *et al*<sup>117</sup>. Estos autores habían realizado estudios tanto de rayos X como de conjugación electrónica en una serie de derivados BODIPY-antraceno con el objetivo de determinar su utilidad como *cassettes* y habían concluido que la presencia de un grupo fenilo y un triple enlace entre los dos fluoróforos generaba una conformación espacial adecuada para la aparición de TBET (figura 25).



**Figura 25.** Cassette desarrollado por Burgess et al.

## 4.2 Resultados y discusión

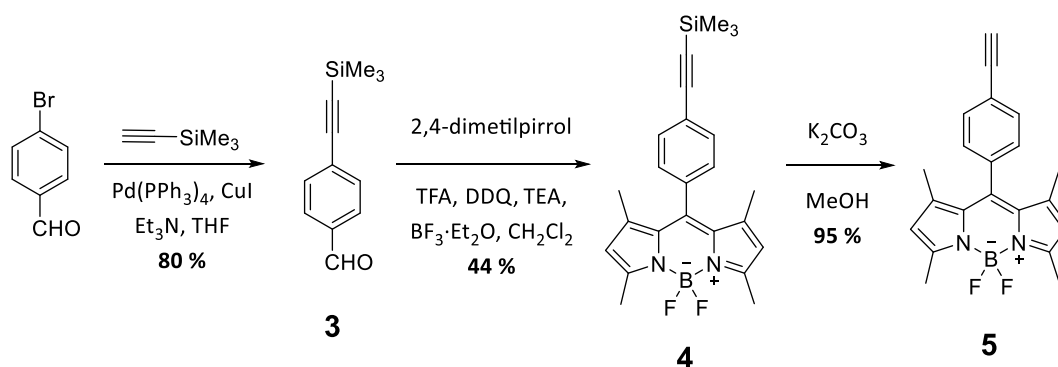
Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, nos planteamos inicialmente la síntesis del dosímetro (**1**) que se muestra en el esquema 12. Dicho sistema propone, por una parte, el uso de un BODIPY como unidad señalizadora por sus interesantes propiedades fluorescentes y por otra, el empleo de una subunidad derivada de la dopamina como unidad de reconocimiento que por reacción con formaldehído se transformaría en la correspondiente dihidroisoquinolina. Dicha dihidroisoquinolina actuaría como unidad dadora en el *cassette* de transferencia de energía a través de un mecanismo TBET, mientras que el BODIPY presente en la molécula lo haría como unidad aceptora (**2**). La elección de una unidad dadora ligeramente distinta a la dopamina utilizada en el trabajo descrito en el capítulo 1 de la presente tesis, reside en una mayor facilidad a la hora de realizar la funcionalización de la molécula (en especial la primera etapa de halogenación) como se discutirá a continuación.



**Esquema 12.** Diseño del dosímetro y mecanismo propuesto para la detección de formaldehído mediante transferencia energética.

#### 4.2.1 Preparación y caracterización unidad aceptora basada en BODIPY

La unidad aceptora basada en BODIPY, unida al espaciador conjugado de etinilfenilo (compuesto **5** en el esquema 13) se obtuvo mediante una síntesis por etapas. Se partió del compuesto comercial 4-bromobenzaldehído y el triple enlace se introdujo mediante una reacción de Sonogashira con trimetilsililacetileno, empleando Pd(0) y una sal de Cu(I) como catalizadores y Et<sub>3</sub>N como base<sup>118</sup>. De este modo se obtuvo el sustrato **3** con un 80 % de rendimiento. La síntesis del BODIPY **4** correspondiente fue efectuada usando las condiciones habituales para la preparación de estos compuestos, consistentes en la condensación del aldehído **3** con dos anillos de pirrol catalizada por ácido (TFA) dando lugar al correspondiente dipirrometano, seguido de un proceso de oxidación *in situ* con DDQ para generar el consiguiente dipirrometeno y, por último, la complejación con trifluoruro de boro en presencia de una base (TEA)<sup>119</sup>. Una vez formado el BODIPY **4** se procedió a la eliminación del grupo protector trimetilsililo por tratamiento con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en metanol, dejando el triple enlace libre para su posterior reacción<sup>120</sup> (esquema 13).



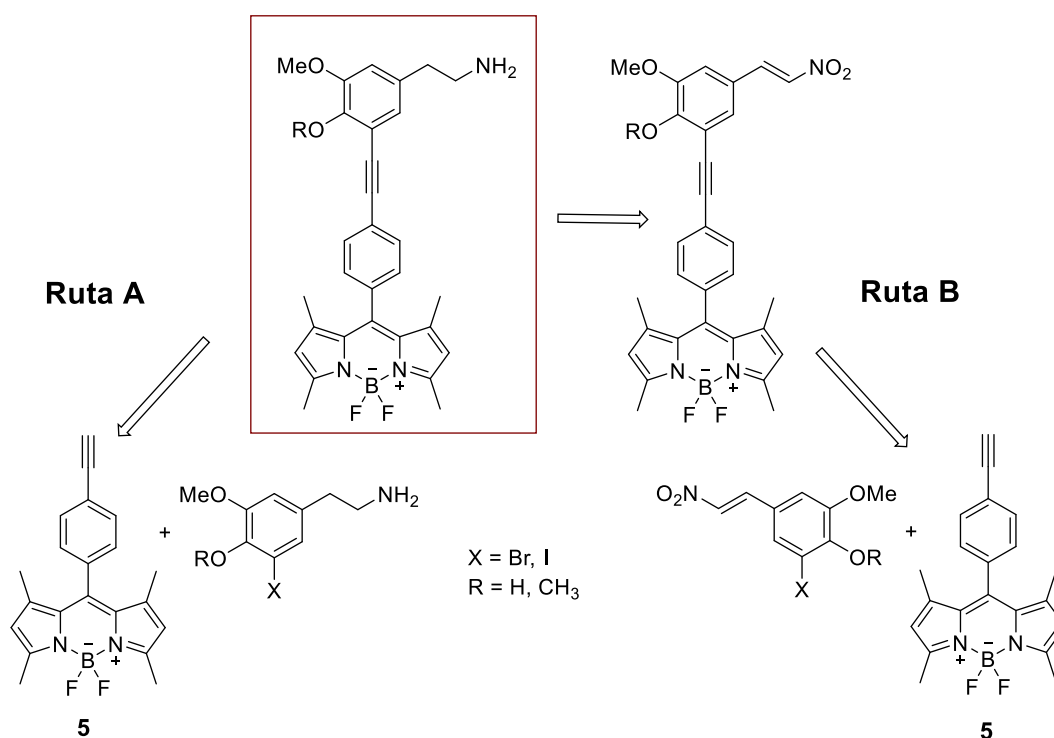
**Esquema 13.** Esquema sintético de la unidad aceptora.

La estructura del compuesto **5** preparado se confirmó mediante resonancia magnética nuclear de carbono y protón, con la aparición de una nueva señal a 3.18 ppm correspondiente al hidrógeno terminal del triple enlace y la presencia de una señal a 5.98 ppm correspondiente a los dos protones del núcleo del BODIPY. También

se observó el correspondiente pico molecular  $[M+H]^+$  de 349.168 g/mol en el espectro de masas.

#### 4.2.2 Preparación de las posibles unidades dadoras y del dosímetro.

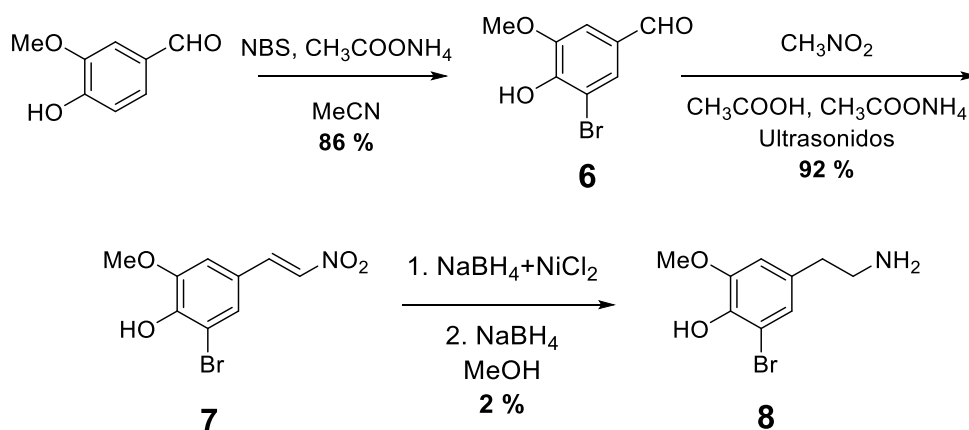
Una vez preparada la unidad aceptora de BODIPY, el paso siguiente era la preparación de la unidad dadora, que tenía que cumplir dos requisitos: El primero de ellos era que en presencia de formaldehído se ciclara dando lugar a la correspondiente dihidroisoquinolina y el segundo que se pudiera hacer reaccionar fácilmente con la unidad aceptora a través de una reacción de Sonogashira para incorporarla al BODIPY con el triple enlace. Para cumplir estos objetivos se plantearon las dos aproximaciones que se recogen en el esquema 14.



**Esquema 14.** Aproximaciones para la preparación del sensor.

La diferencia fundamental entre ambas rutas consiste en abordar la reacción de reducción para generar la amina antes o después de la reacción de Sonogashira. La

primera ruta evaluada (**ruta A**) proponía emplear directamente la amina en la reacción de acoplamiento. La síntesis de la amina **8** (X= Br, R= H) se planteó partiendo del sustrato comercial 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (vainillina) según se muestra en el esquema 15. Para la bromación se utilizó N-bromosuccinimida y las condiciones descritas por Biswanath Das *et al*<sup>121</sup> para bromar diversos sustratos en posiciones específicas, entre ellos la vainillina. Empleando estas condiciones, el producto bromado **6** se obtuvo con un rendimiento del 86%. El paso siguiente de la síntesis fue una condensación nitroaldólica entre el grupo aldehído de **6** y nitrometano promovida por ultrasonidos, con el objetivo de reducir las posibles reacciones secundarias mediante la disminución de la temperatura necesaria<sup>122</sup>, obteniéndose **7** con un rendimiento del 92 %. Desafortunadamente, la posterior reducción del grupo nitro para dar la amina **8** correspondiente dio lugar a muchos problemas. Se intentó llevar a cabo haciendo uso de numerosos reactivos (H<sub>2</sub> en presencia de Pd/C, Red-Al®, Sml<sub>2</sub>, LiAlH<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>S, etc.) y condiciones sin éxito, obteniendo en todos los casos el producto de partida sin reaccionar o mezclas muy complejas donde no se observaba el producto deseado. Únicamente se pudo aislar el compuesto **8** con un rendimiento del 2% cuando se empleó una mezcla de NaBH<sub>4</sub>+NiCl<sub>2</sub>. Para ello, primero se dejó reaccionar una mezcla de NaBH<sub>4</sub>+NiCl<sub>2</sub> en metanol y tras 30 minutos, se añadió **7** junto con una nueva adición de NaBH<sub>4</sub>, con el objetivo de reducir simultáneamente tanto el doble enlace como el grupo nitro<sup>123</sup>.

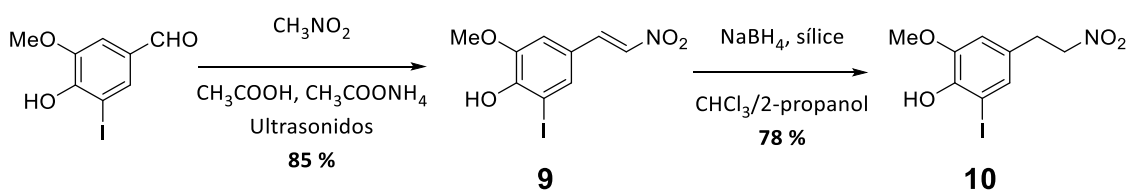


Esquema 15. Esquema sintético para la obtención del derivado bromado.



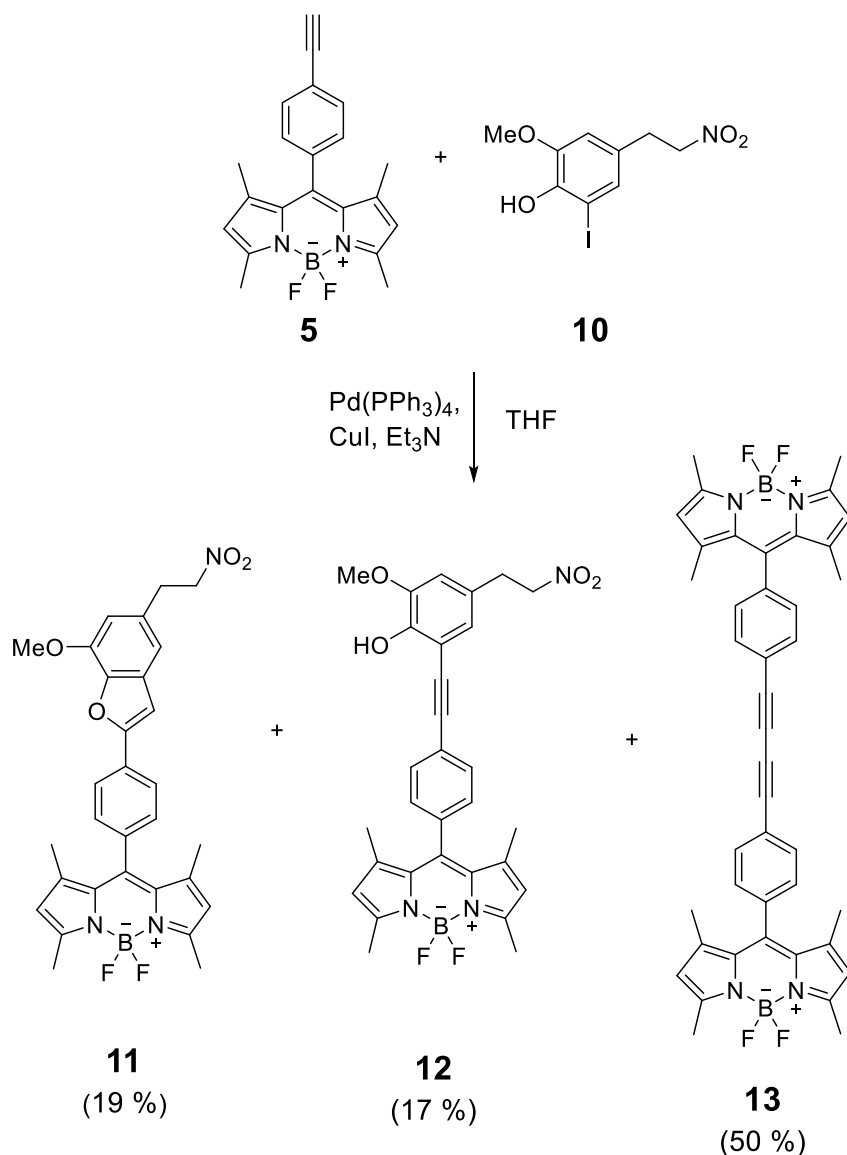
Como la preparación del nitroderivado **7** transcurría con rendimientos muy elevados, lo que permitía disponer del compuesto con facilidad, se decidió estudiar una segunda aproximación consistente en llevar a cabo el acoplamiento con el BODIPY utilizando este compuesto y llevar a cabo la reacción de reducción del grupo nitro y el doble enlace en la última etapa de la síntesis del sensor (**ruta B**). Sin embargo, el acoplamiento entre **5** y **7** haciendo uso de la reacción de Sonogashira bajo distintas condiciones experimentales no condujo al compuesto deseado, obteniéndose el BODIPY de partida en todos los casos. Por ello, con el objetivo de aumentar la reactividad durante la reacción de acoplamiento, se decidió modificar la estructura del compuesto sustituyendo el átomo de bromo por yodo.

Para ello, la síntesis de la nueva unidad dadora se llevó a cabo partiendo del sustrato comercial 5-iodovainillina sobre el que se realizó una condensación nitroaldólica con nitrometano en las condiciones empleadas anteriormente<sup>122</sup>. La reacción transcurrió de la forma esperada, conduciendo al producto deseado (**9**) con un rendimiento del 85%. A continuación, se llevó a cabo primero la reducción del doble enlace, para simplificar y favorecer la posterior etapa de reducción a amina, usando borohidruro sódico y sílice como fase prótica insoluble y así evitar que el intermedio de la reacción experimentara una adición de Michael<sup>124</sup>, aislándose el nuevo nitroderivado **10** con un rendimiento del 78% (esquema 16). Por último, se trató de llevar a cabo la reducción del grupo nitro a amina usando numerosos reactivos y condiciones de reducción, pero de nuevo se produjeron numerosos problemas relacionados, tanto con la reacción de reducción en sí misma como con los procesos de purificación y aislamiento del producto. Por ello, y por las mismas razones expuestas anteriormente, se decidió realizar el acoplamiento entre el BODIPY **5** el nitroderivado **10** y llevar a cabo la reducción del grupo nitro posteriormente.



**Esquema 16.** Esquema sintético de la unidad dadora.

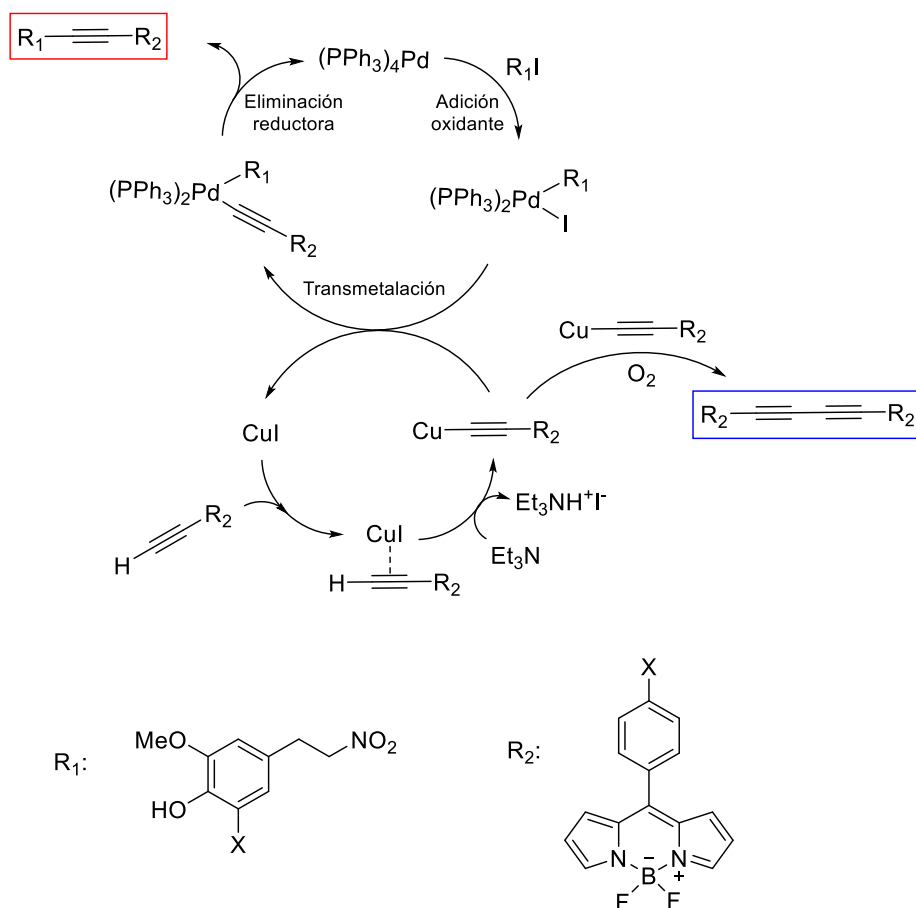
Así pues, se llevó a cabo la reacción de acoplamiento entre el nitroderivado **10** y el etinilfenil BODIPY **5** en presencia de  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ ,  $\text{CuI}$  y trietilamina. La mezcla obtenida en dicha reacción fue analizada por resonancia magnética nuclear de protón y carbono, así como por espectrometría de masas, observándose la presencia tanto del producto de reacción esperado (**12**, rendimiento del 17 %) como de dos subproductos mayoritarios, **11** y **13** (esquema 17). Los tres compuestos fueron caracterizados por resonancia magnética nuclear de protón, carbono y espectrometría de masas, mientras que **11** y **12** también fueron caracterizados mediante HSQC y HMBC.



**Esquema 17.** Reacción de Sonogashira entre **5** y **10** y la mezcla de productos obtenidos.

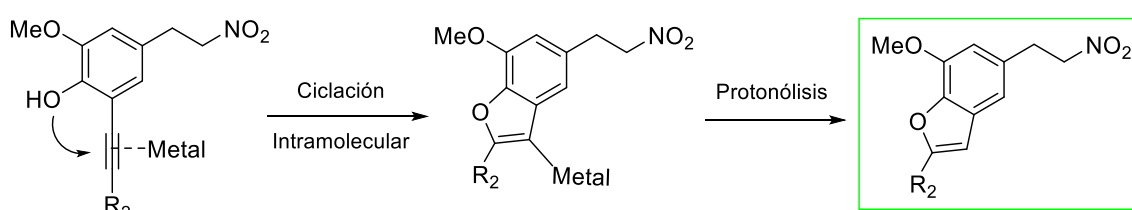
El más abundante de los subproductos, el compuesto **13** (50 %) fue el resultante de la dimerización de **5** mediante un acoplamiento de Glaser<sup>125</sup>. Dicho acoplamiento acetilénico se produce catalizado por una sal de Cu (I) y un oxidante como el oxígeno. A pesar de que se intentó minimizar la aparición de dicho producto eliminando todo el oxígeno posible del matraz y la mezcla de reacción, no se obtuvieron mejoras sustanciales en el rendimiento del compuesto deseado, ya que la misma especie intermedia necesaria para la etapa de transmetalación durante la

reacción de Sonogashira, es la que evoluciona para dar el homoacoplamiento del BODIPY. Por otra parte, el segundo subproducto identificado en la mezcla de reacción (**11**, 19 %) procede muy probablemente de la ciclación intramolecular de **12** (el producto deseado) catalizada por Cu(I) o Pd(II) en las condiciones de reacción para dar lugar al benzofurano correspondiente. Esta reacción se llevaría a cabo una vez formado el producto de la reacción de Sonogashira inicial, que posee grupos arilacetileno e hidroxilo en posiciones contiguas y que debido a la presencia una sal de Cu o Pd en el medio daría lugar a la ciclación del compuesto<sup>126,127</sup>. Un mecanismo de reacción probable para la formación de compuestos **12** y **13** de acuerdo con la literatura<sup>128</sup>, se muestra a continuación (esquema 18).



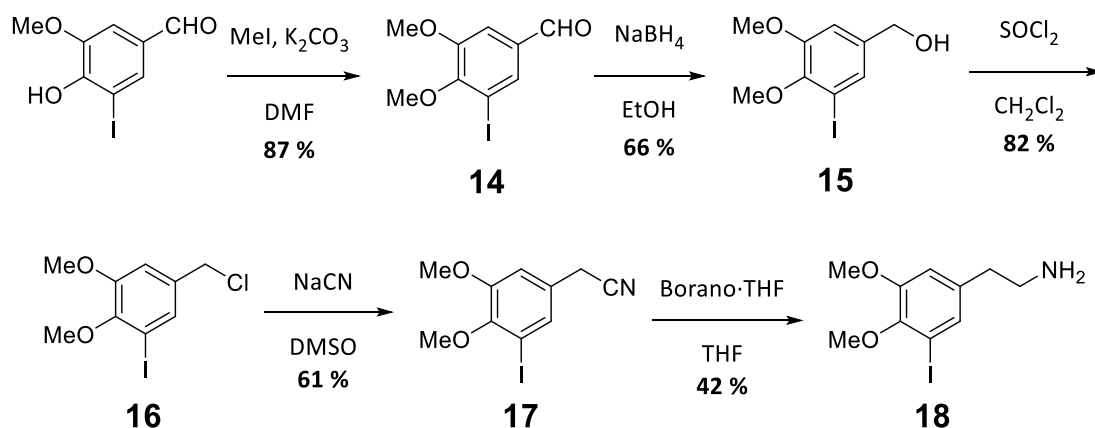
**Esquema 18.** Mecanismo de reacción probable según la literatura para la formación de **12**, **13**.

Por otra parte, la formación del derivado benzofuránico **11** podría explicarse a través de la coordinación de Cu(I)<sup>127</sup> o Pd(II)<sup>126</sup> con el triple enlace, una desprotonación del grupo hidroxilo y posterior ciclación intramolecular y, por último, la protonólisis del enlace con el metal para dar lugar al producto observado (esquema 19). Esta reacción es conocida para sustratos similares como puede observarse en las referencias 126 y 127.



**Esquema 19.** Mecanismo de reacción probable según la literatura para la formación de **11**.

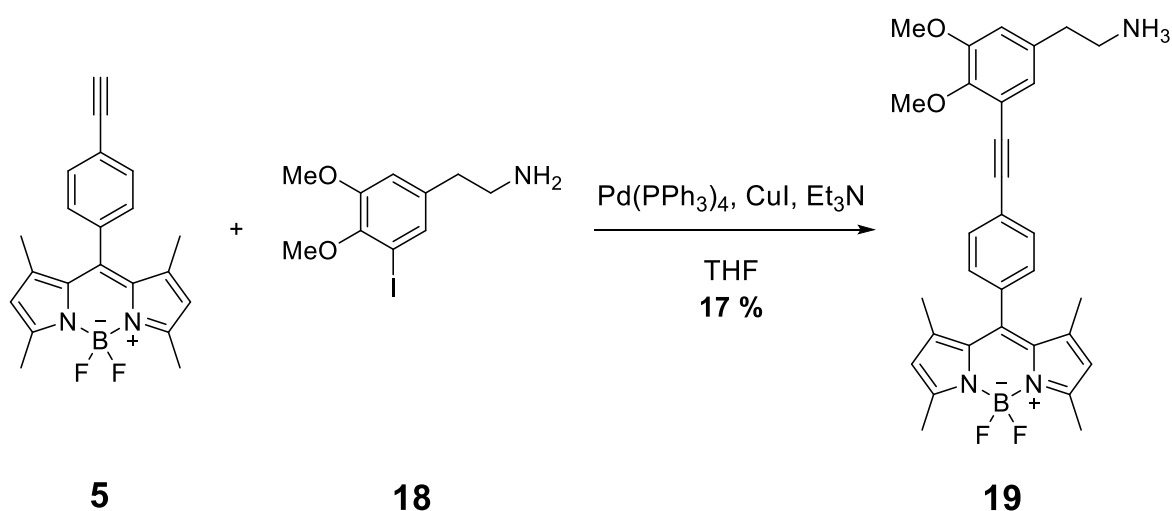
De igual modo que se realizó con el compuesto **10**, se trató de realizar la reducción del grupo nitro del compuesto **12** a amina con diferentes métodos y reactivos, pero de nuevo se produjeron numerosos problemas relacionados, tanto con la reacción de reducción en sí misma como con los procesos de purificación y aislamiento del producto. Debido a la dificultad para reducir el grupo nitro a amina y a la aparición de los productos secundarios obtenidos en la reacción de acoplamiento cruzado, se decidió, por un lado, llevar a cabo un pequeño cambio en el diseño inicial del dosímetro, metilando el hidroxilo libre para evitar la reacción de ciclación intramolecular que conduce al derivado benzofuránico. Por otro lado, se propuso una ruta sintética alternativa para llegar hasta la amina por reducción de un nitrilo en lugar de un nitroderivado. La síntesis de la nueva unidad dadora **18** se muestra en el esquema 20.



**Esquema 20.** Ruta sintética alternativa para la obtención de la unidad dadora **18**.

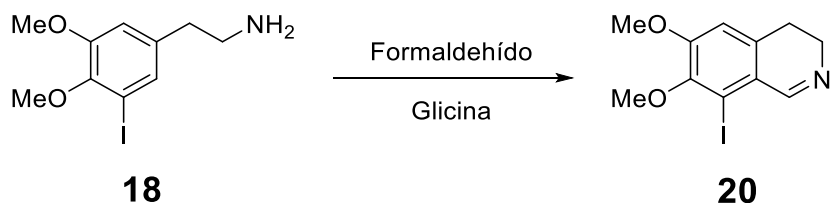
La primera etapa de esta síntesis consistió en la metilación del grupo hidroxilo del anillo aromático mediante reacción con yoduro de metilo<sup>129</sup>. A continuación, se redujo el grupo aldehído de **14** con borohidruro de sodio en etanol<sup>130</sup> para obtener el alcohol bencílico **15** y éste se convirtió en el correspondiente cloruro de alquilo **16** con buen rendimiento usando cloruro de tionilo en diclorometano<sup>130</sup>. Finalmente, la sustitución del cloruro por un grupo ciano mediante el uso de cianuro sódico en DMSO como disolvente<sup>130</sup> y su posterior reducción con un complejo borano-tetrahidrofurano<sup>130</sup>, dieron como resultado la molécula deseada (**18**) con un rendimiento aceptable.

Una vez obtenidos el etinilfenil BODIPY **5** y el aminoderivado **18**, se llevó a cabo el acoplamiento de Sonogashira entre ambos compuestos en presencia de  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ ,  $\text{CuI}$  y trietilamina para obtener el dosímetro **19** (esquema 21). La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía en columna y se analizó por resonancia magnética nuclear de protón observándose la desaparición de la señal a 3.18 ppm correspondiente al protón libre del triple enlace y manteniéndose los tripletes a 2.81 y 3.07 ppm característicos del grupo etilamina de la unidad dadora. En el espectro de masas se observó el pico  $\text{M}+\text{H}$  del compuesto **19** confirmándose la presencia del dosímetro.



**Esquema 21.** Reacción de Sonogashira entre **5** y **18**.

También se llevó a cabo la reacción del compuesto **18** con formaldehído para de ese modo tener identificado el correspondiente compuesto de la reacción de Pictet-Spengler para el compuesto dimetilado (esquema 22).



**Esquema 22.** Reacción de **18** con formaldehído y glicina para dar **20**.

Para establecer las condiciones de reacción para que esta transformación tuviera lugar a temperatura ambiente se procedió a estudiar la concentración mínima del sustrato necesaria para que el proceso se pudiera observar. Para ello, se prepararon disoluciones de **18** y glicina a distintas concentraciones ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  M) y se añadió formaldehído (1 M). Mediante espectroscopía UV-vis y de fluorescencia se comprobó que para que se observara la aparición de nuevas bandas asociadas a **20**, la concentración mínima necesaria era  $10^{-3}$  M. El estudio de la mezcla de reacción por espectrometría de masas permitió confirmar la presencia de **20** al observarse un pico a 350.02 ( $\text{M}+\text{H}+\text{MeOH}$ ). Se llevaron a cabo estudios adicionales encaminados a evaluar

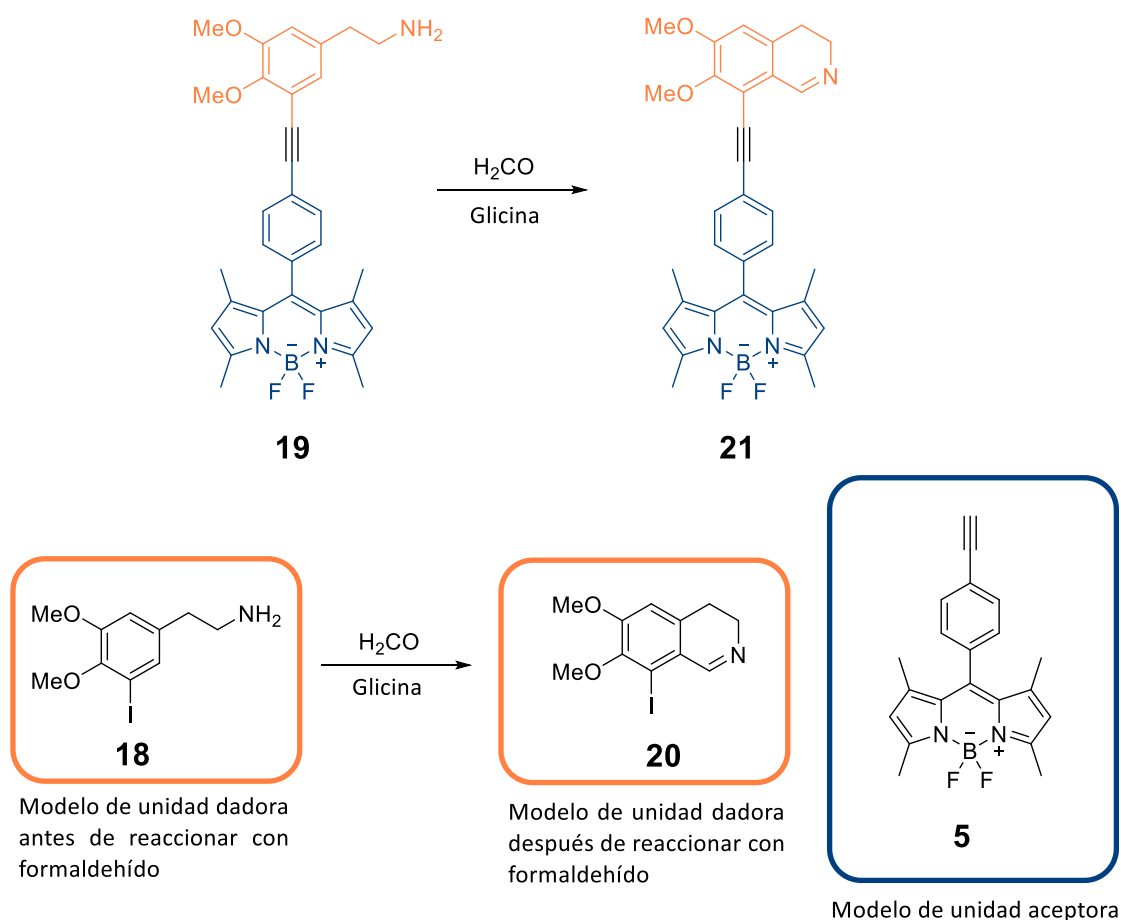
la influencia de un cambio de disolvente de medio orgánico a acuoso tamponado, no observándose cambios significativos ni en el espectro de UV-vis ni en el de fluorescencia. Igualmente se comprobó que, aunque la presencia de glicina no daba lugar a cambios muy grandes en el espectro de UV-vis y fluorescencia, sí se observaba cierto aumento en la señal correspondiente a **20**, por lo que se mantuvo dicho compuesto en las experiencias siguientes.

#### 4.2.3 Propiedades ópticas de los sistemas preparados

Con objeto de estudiar el posible comportamiento como *cassette* de **19**, era necesario conocer previamente las características espectroscópicas de las dos unidades presentes en la molécula: la unidad de reconocimiento que actuaría como unidad dadora del hipotético sistema *cassette*, tanto antes de la reacción con formaldehído (compuesto **18**) como después (compuesto **20**) así como las de la subunidad señalizadora (compuesto **5**) que sería la aceptora del sistema *cassette* (esquema 23).



Capítulo 4. Aproximación al uso de sistemas *cassette* de transferencia de energía basados en BODIPY para la detección de formaldehído

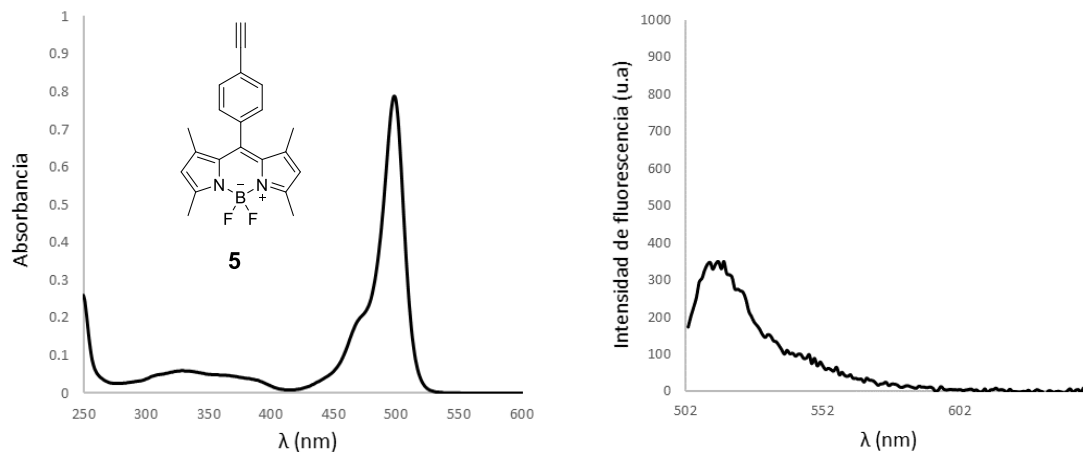


**Esquema 23.** Potencial *cassette* y compuestos modelos empleados en el estudio comparativo de las propiedades ópticas de las distintas posibles especies presentes en el proceso de detección.

Se decidió estudiar previamente las características espectroscópicas de las dos unidades presentes en la molécula. Por una parte, **5** como unidad aceptora del sistema *cassette* y **18** como precursor de la unidad dadora, así como el producto de reacción de **18** con formaldehído, que se presume actuará como unidad dadora del sistema *cassette*.

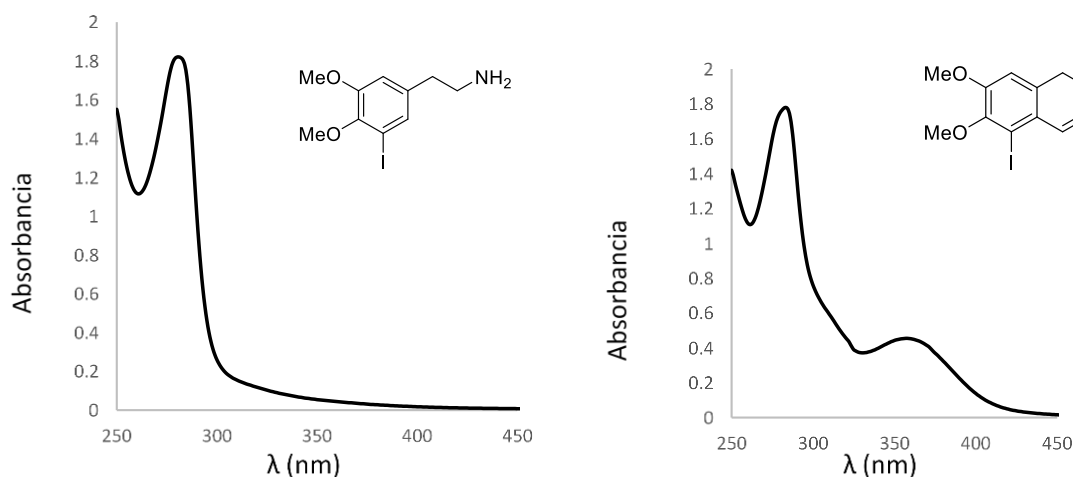
El compuesto **5** (subunidad correspondiente al BODIPY) muestra una banda principal en el espectro de absorción a 500 nm y dos bandas de menor intensidad a 468 y 335 nm exhibiendo una coloración amarilla en acetonitrilo (gráfica 10, izquierda). El coeficiente de extinción molar obtenido para cada una de ellas es 78600, 18400 y 5800  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  respectivamente. Por lo que respecta al espectro de fluorescencia,

presenta una banda muy intensa centrada a 514 nm (Slit excitación: 2.5 Slit emisión: 2.5,  $\lambda_{exc}$  = 500 nm, gráfica 10, derecha).



**Gráfica 10.** (Izquierda) Espectro de absorción de **5**,  $10^{-5}$  M en acetonitrilo. (Derecha) Espectro de fluorescencia de **5**,  $10^{-5}$  M en acetonitrilo. Slit excitación: 2.5 Slit emisión: 2.5,  $\lambda_{exc}$  = 500 nm.

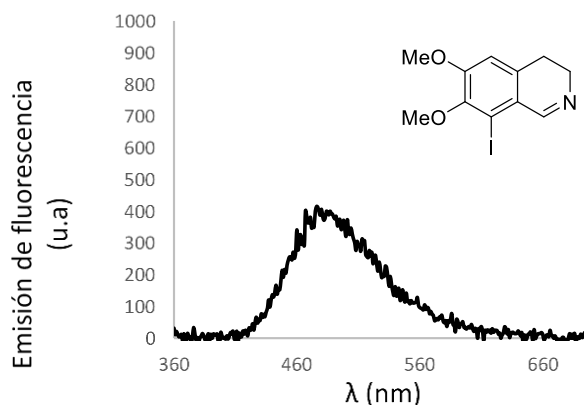
Por otro lado, se estudiaron las propiedades ópticas de la unidad dadora antes y después de reaccionar a temperatura ambiente durante 15 minutos con una concentración final de formaldehído 1 M (compuestos **18** y **20** respectivamente) y 0.2 equivalentes de glicina respecto a **18**. Los espectros de UV-vis de **18** se registraron empleando una disolución  $10^{-3}$  M de dicho compuesto en acetonitrilo, ya que, como se ha indicado anteriormente, esta era la concentración mínima necesaria para que se observara la correspondiente reacción de ciclación. En los espectros registrados, se observó la presencia de una banda de absorción a 283 nm, con un coeficiente de extinción molar de  $1806 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , por lo que, al no estar la absorción dentro del rango visible, la disolución es incolora (gráfica 11, izquierda). Cuando se comparan los espectros de absorción de **18** y **20** (gráfica 11, derecha), se observa en este último la aparición de una nueva banda a 357 nm manteniéndose también la banda a 283 nm. De estos datos se puede concluir que la aparición de la banda a 357 nm se puede relacionar con la ciclación del sistema para generar la dihidroisoquinolina.



**Gráfica 11.** Espectro de absorción de **18** (izquierda) y **20** (derecha) en acetonitrilo,  $10^{-3}$  M.

En relación con las propiedades fluorescentes de **18** y **20** en disoluciones  $10^{-3}$  M en acetonitrilo (excitando a 357 nm), se puede indicar que mientras que **18** no es fluorescente, **20** sí lo es mostrando su banda de emisión a 485 nm (gráfica 12).

Cuando se comparan las propiedades ópticas de la unidad aceptora **5** y la dadora después de la reacción con formaldehído (compuesto **20**), se puede concluir que este último compuesto es mucho menos fluorescente que el primero, ya que para observar la emisión en este caso se necesitan concentraciones  $10^{-3}$  M mientras que en el caso de **5** la emisión se observa perfectamente a concentraciones de  $10^{-5}$  M. Es decir, que a concentraciones semejantes la emisión de la unidad receptora es despreciable frente a la de la unidad señalizadora. Además, mientras que la banda de emisión de **5** aparece a 514 nm la de **20** lo hace a 485 nm (gráfica 12).



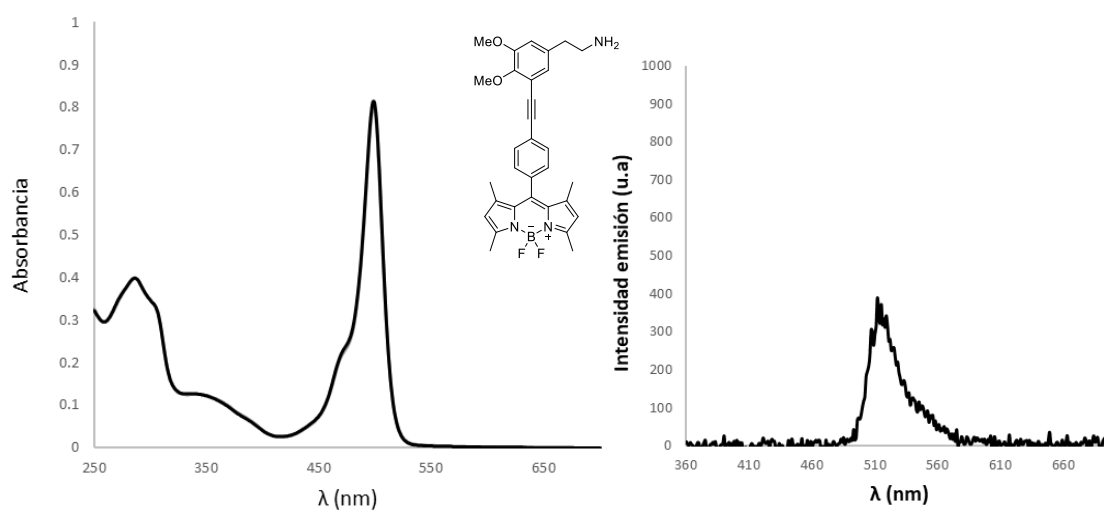
**Gráfica 12.** Espectro de fluorescencia de  $20 \cdot 10^{-3}$  M en acetonitrilo Slit excitación: 2.5 Slit emisión: 5,  $\lambda_{exc}=357$  nm.

Una vez conocidas las propiedades ópticas de los distintos fragmentos usados como modelos de las subunidades presentes en el sensor **19**, se pasó a evaluar la capacidad de detección del mismo.

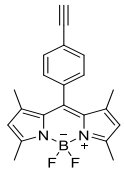
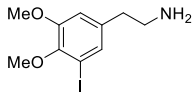
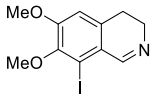
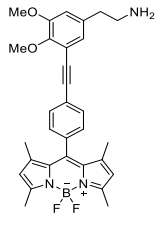
El dosímetro **19** muestra en su espectro de UV-vis (gráfica 13, izquierda) cuatro bandas de absorción principales a 500, 468, 350 y 283 nm, con coeficientes de extinción molar de 79900, 18300, 12100 y 39900  $M^{-1} cm^{-1}$  respectivamente, lo que confiere a la disolución una coloración amarilla. Teniendo en cuenta los estudios realizados con los modelos, es aceptable asignar las bandas a 500, 468 y 350 nm a la subunidad de BODIPY, mientras que la banda a 283 correspondería claramente a la parte de feniletilamina.

Por otro lado, en el espectro de fluorescencia se observa una banda centrada a 517 nm cuando se irradia a 357 nm (gráfica 13, derecha) que claramente corresponde a la subunidad de BODIPY. En la tabla 3 se recogen los valores de las bandas de absorción y emisión de los compuestos estudiados.

Capítulo 4. Aproximación al uso de sistemas *cassette* de transferencia de energía basados en BODIPY para la detección de formaldehído



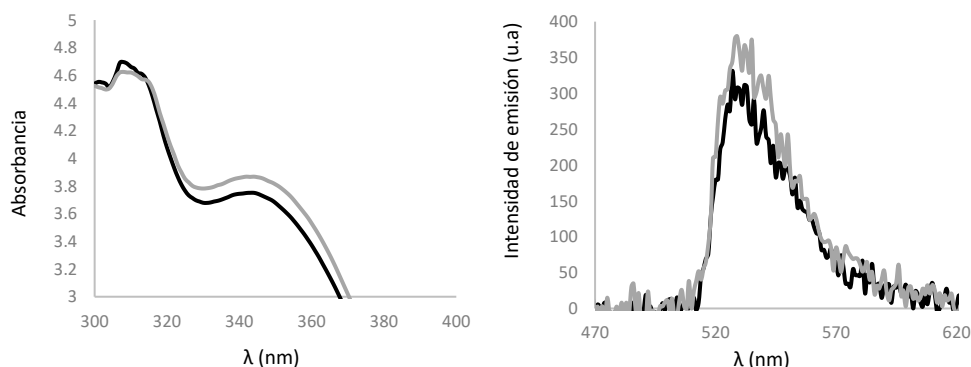
**Gráfica 13.** (Izquierda) Espectro de absorción de **19**  $10^{-5}$  M en acetonitrilo. (Derecha) Espectro de fluorescencia de **19**  $10^{-5}$  M Slit excitación: 2.5 Slit emisión: 5,  $\lambda_{\text{exc}} = 357$  nm.

Compuesto				
	<b>5</b>	<b>18</b>	<b>20</b>	<b>19</b>
<b>Absorbancia</b> $\lambda_{\text{máx}}$ ( $\epsilon$ )	500 nm (78600) 468 nm (18400) 335 nm (5800)	283 nm (1804)	284 nm (1806) 357 (450)	500 nm (79900) 468 nm (18300) 350 nm (12100) 283 nm (39900)
<b>Emisión de Fluorescencia</b> $\lambda_{\text{exc}}$ (357 nm)	515 nm (intensa)	No fluorescente	485 nm (débil)	517 nm (intensa)

**Tabla 3.** Valores de las bandas de absorción y emisión de los compuestos estudiados.

Cuando se registraron los espectros de la disolución del compuesto **19**  $10^{-3}$  M en acetonitrilo en presencia de un exceso de formaldehído, se observó un ligero incremento en la banda de absorción que aparece a 350 nm (gráfica 14, izquierda). Teniendo en cuenta lo indicado anteriormente, este incremento debe de estar

relacionado con la ciclación de la feniletilamina para dar la dihidroisoquinolina ya que en el compuesto **20** se observa la aparición de una banda de absorción en esos valores que se sumaría a la propia de **19** dando lugar al incremento observado.



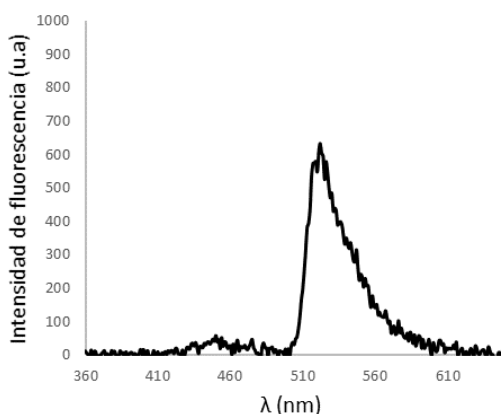
**Gráfica 14.** (Izquierda) Espectro de absorción de **19**  $10^{-3}$  M en acetonitrilo antes (línea negra) y después (línea gris) de reaccionar con formaldehído (1 M) y glicina (0.2 equivalentes respecto a **19**). (Derecha) Espectro de emisión de fluorescencia de **19**  $10^{-3}$  M en acetonitrilo antes (línea negra) y después (línea gris) de reaccionar con formaldehído y glicina. Slit excitación: 2.5 Slit emisión: 5,  $\lambda_{exc}$  = 357 nm.

Por lo que respecta a la emisión de fluorescencia, tras excitar a 357 nm (correspondiente a la longitud de onda máxima de absorción de **20**), se obtiene una banda centrada a 522 nm asociada a la emisión de la unidad aceptora que sufre un ligero aumento en presencia de formaldehído, concretamente del 24 %. Este incremento podría estar relacionado con la reacción de ciclación que incrementa la absorción en la zona de los 357 nm (gráfica 14, derecha).

Con el fin de comprobar si estas pequeñas modificaciones eran debidas a la formación de **21**, se realizó un estudio de la mezcla de reacción mediante espectrometría de masas. Las masas calculadas para **19** y **21** son 527.26 y 537.24 respectivamente, mientras que las observadas en el espectro de masas de la mezcla de reacción fueron 528.26 (**19**+H) y 538.24 (**21**+H). Estos datos confirman la presencia de **19** en la disolución de partida, así como la aparición de **21** tras la adición de formaldehído, aunque sigue observándose la señal correspondiente a **19** en gran medida.

Una vez confirmada la presencia de **21** en la disolución, cabe destacar que en el espectro de fluorescencia no se observa la presencia de la banda a 485 nm característica de **20**. Este hecho podría estar indicando que el proceso de transferencia energética entre la unidad dadora y aceptora está teniendo lugar, justificando el hecho de que se produzca un aumento en la intensidad de emisión de la unidad aceptora a 522 nm y la desaparición de la banda correspondiente a la unidad dadora a 485 nm.

Para tratar de confirmar estas conclusiones se mezcló en un mismo vial 1 mL de **5** ( $10^{-3}$  M) y 1 mL de **20** ( $10^{-3}$  M) y se registró el espectro de fluorescencia de la mezcla excitando a 357 nm (gráfica 15) con el objetivo de comprobar si la presencia de ambos fluoróforos (sin estar unidos covalentemente y por tanto no existiendo una transferencia energética entre ambos) daba lugar a dos bandas diferenciadas en el espectro de emisión.



**Gráfica 15.** Espectro de fluorescencia de la mezcla de **5** ( $10^{-3}$  M) y **20** ( $10^{-3}$  M). Slit excitación: 2.5 Slit emisión: 5,  $\lambda_{exc}$  = 357 nm.

Como puede observarse en la gráfica anterior, la banda de emisión del BODIPY **5** es visible, así como en menor medida la de la dihidroisoquinolina **20**. Este hecho indica que en el experimento representado en la gráfica 14, donde se hace reaccionar el dosímetro **19** con formaldehído y únicamente se observa el aumento de la emisión del BODIPY, podría estar produciéndose una transferencia energética entre ambas unidades, ya que, de no ser así debería observarse la señal a 485 nm correspondiente a la dihidroisoquinolina.

A la vista de los experimentos realizados y los resultados obtenidos, se podría sugerir que el dosímetro diseñado presenta un comportamiento coherente con una estructura de tipo *cassette* en la que tiene lugar un proceso de transferencia energética que aumenta la emisión fluorescente de la unidad aceptora tras la adición de formaldehído. Desgraciadamente, este aumento es por el momento demasiado reducido como para alcanzar límites de detección cercanos a los establecidos por agencias como el “National Institute for Occupational Safety and Health” (NIOSH).

Tras analizar los resultados obtenidos, se pueden establecer dos factores principales que explicarían la baja efectividad del sistema. Por un lado, un reducido rendimiento obtenido en la reacción de Pictet-Spengler con el formaldehído y la posterior etapa de deshidrogenación (tal y como se deduce del espectro de masas realizado) que genera en el medio una baja concentración de **21** dificultando la visualización del proceso de transferencia energética y, por tanto, el proceso de detección de formaldehído. Por otro lado, la gran diferencia en el valor de coeficiente de extinción molar de la banda en la zona de 350 nm entre la unidad dadora (dihidroisoquinolina, **20**  $\epsilon = 450$ ) y aceptora (BODIPY, **5**  $\epsilon = 5800$ ) dificulta en gran medida encontrar una región del espectro UV-visible donde la emisión de la unidad aceptora no enmascare la posible señal de la unidad dadora.



### 4.3 Conclusiones

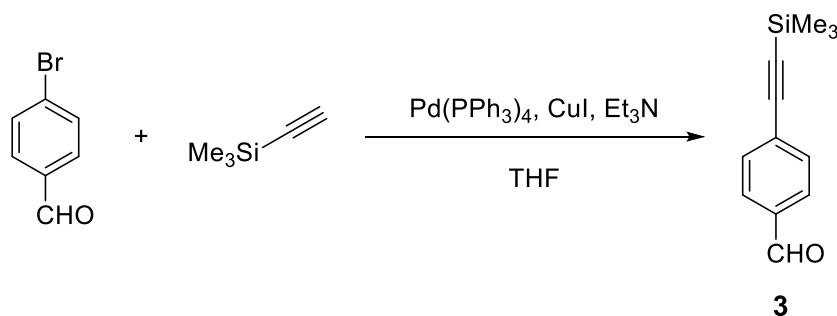
En el presente capítulo se ha sintetizado el dosímetro **19** basado en un BODIPY como unidad señalizadora y un derivado de dopamina como unidad de reconocimiento. Se han caracterizado estructuralmente ambas unidades mediante resonancia magnética de protón y carbono, así como por espectrometría de masas. De igual modo, se han registrado los espectros de UV-visible y fluorescencia de ambas unidades. Se ha llevado a cabo el estudio del comportamiento frente a formaldehído de la unidad de reconocimiento y del sensor completo, observándose diferencias en las bandas de UV-visible y fluorescencia en presencia y ausencia de formaldehído, lo que parecen indicar un proceso de transferencia energética entre la unidad dadora generada tras la adición de formaldehído y la unidad de BODIPY aceptora, lo que aumenta la emisión fluorescente de esta última. Desafortunadamente el incremento observado es demasiado pequeño para que el sistema diseñado tenga utilidad práctica como sensor de formaldehído.

## 4.4 Parte experimental

### Consideraciones generales

Todos los reactivos utilizados están disponibles comercialmente y han sido usados sin purificación previa. Los disolventes empleados fueron destilados sobre Na y benzofenona (THF),  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) o tamiz molecular (el resto de los disolventes) antes de su uso. Para las cromatografías en capa fina se utilizó gel de sílice 60  $\text{F}_{254}$  (Merck) y para las columnas cromatográficas gel de sílice 60 (40-63  $\mu\text{m}$ , Merck). Los espectros de UV-vis se registraron con un espectrofotómetro Shimadzu UV-2101PC utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm de longitud y los espectros de fluorescencia se registraron en un fluorímetro Varían Cary Eclipse. Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón fueron obtenidos con un espectrómetro Bruker DPX300 300 MHz. Los espectros de masas de alta resolución fueron registrados utilizando un espectrómetro TripleTOF™ 5600 (AB SCIEX).

### Síntesis de 4-((trimetilsilil)etnil)benzaldehído (**3**)

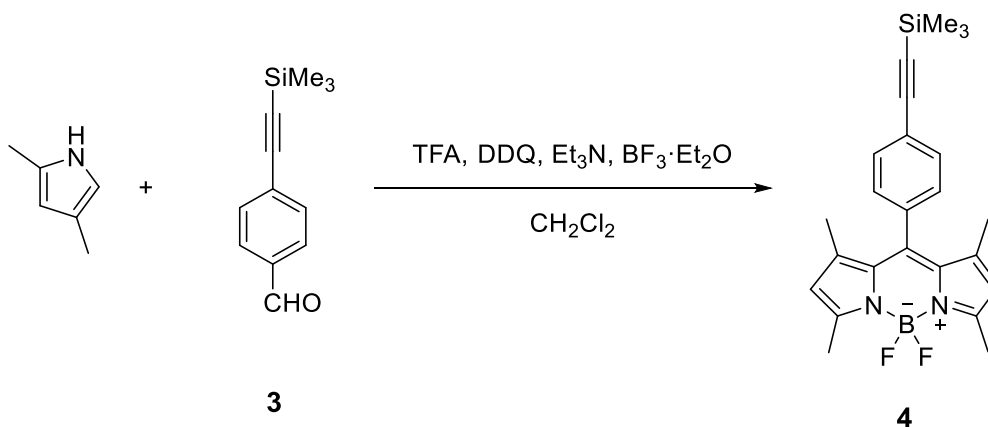


En un matraz de fondo redondo de 100 mL y bajo atmósfera de argón se disolvió una mezcla de 4-bromobenzaldehído (300 mg, 1.62 mmol),  $\text{CuI}$  (30.88 mg, 0.16 mmol) y  $\text{Pd(PPh}_3)_4$  (75 mg, 0.06 mmol) en 50 mL de THF seco. A continuación, se añadió  $\text{Et}_3\text{N}$  (907  $\mu\text{L}$ , 6.51 mmol) y trimetilsililacetileno (270  $\mu\text{L}$ , 2.43 mmol). La reacción se mantuvo a temperatura ambiente, bajo argón y con agitación durante 12

horas. Finalizado este tiempo se filtraron los sólidos presentes, se lavaron con acetato de etilo, y todas las fases orgánicas reunidas se secaron con sulfato magnésico anhidro, se concentró la disolución a sequedad y se purificó mediante cromatografía en columna (sílica gel, hexano/acetato de etilo, 8:2), obteniéndose **3** como un aceite de color marrón oscuro con un rendimiento del 80 %.

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 9.99 (s, 1H), 7.81 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.60 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 0.27 (s, 9H).

#### Síntesis de **4**

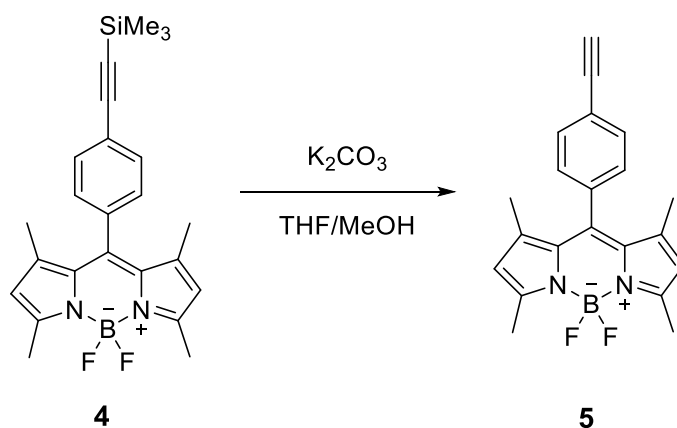


En un matraz de fondo redondo de tres bocas se disolvió el aldehído **3** (465 mg, 2.48 mmol) y 2,4-dimetilpirrol (537 µL, 5.21 mmol) en 250 mL de diclorometano seco bajo atmósfera de argón. Una vez disueltos se añadió ácido trifluoroacético (10 µL, 0.13 mmol) y se agitó la disolución a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, se añadió 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (564 mg, 2.48 mmol) disuelto en diclorometano seco y se mantuvo 50 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se agregó trietilamina (5.37 mL, 38.44 mmol) y la mezcla se dejó reaccionando durante 30 minutos más. Por último, se añadió trifluoruro de boro dietil éter (5.37 mL, 43.4 mmol) y se agitó durante 2 horas y 30 minutos. Una vez pasado este tiempo la disolución se concentró a vacío y se purificó mediante columna

cromatográfica (sílica gel, hexano/acetato de etilo, 95:5), obteniéndose **4** como un sólido de color rojizo con un rendimiento del 44 %.

**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.60 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.24 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 5.98 (s, 2H), 2.55 (s, 6H), 1.40 (s, 6H), 0.28 (s, 9H).

### Síntesis de 5



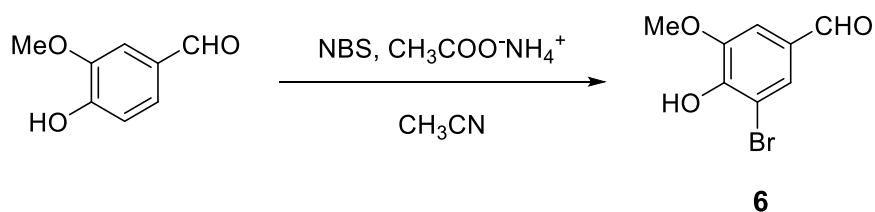
En un matraz de fondo redondo de 25 mL provisto de agitación magnética, se disolvió **4** (20 mg, 0.05 mmol) en una mezcla de THF/metanol (1:1). Una vez disuelto se añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (9.8 mg, 0.07 mmol) y la reacción se mantuvo a temperatura ambiente. Transcurrida una hora, la disolución se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (sílica gel, hexano/acetato de etilo, 9:1), obteniéndose **5** como un sólido de color rojizo con un rendimiento del 95 %.

**<sup>1</sup>H RMN** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.62 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.27 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 5.98 (s, 2H), 3.18 (s, 1H), 2.55 (s, 6H), 1.40 (s, 6H).

**<sup>13</sup>C RMN** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 155.99, 143.11, 140.70, 135.74, 133.01, 131.28, 128.37, 123.10, 121.54, 83.03, 78.71, 14.76

**HRMS** (EI): m/z (%) calculada para C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> es de 349.169 y la masa [M+H]<sup>+</sup> obtenida fue de 349.168.

### Síntesis de 3-bromo-4-hidroxi-5-metoxibenzaldehído (**6**)

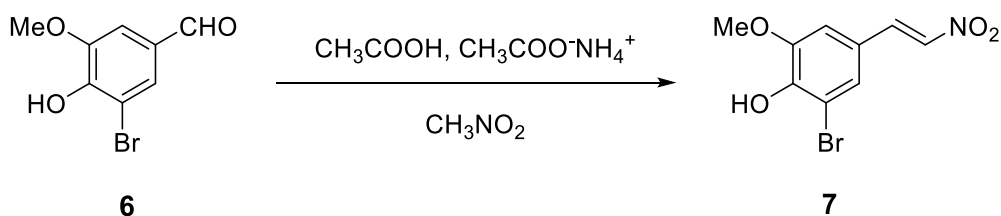


En un matraz de fondo redondo de 100 mL se disolvieron 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (250 mg, 1.64 mmol) y  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (12.5 mg, 0.16 mmol) en acetonitrilo (40 mL). A continuación, se añadió N-bromosuccinimida (307 mg, 1.72 mmol) con agitación a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción, indicada por CCF, se filtró el crudo de reacción y se concentró a vacío. A continuación, se extrajo varias veces con acetato de etilo/agua. Se recogieron las fracciones orgánicas, se secaron y se concentraron a vacío obteniéndose **6** como un sólido blanquecino con un 86 % de rendimiento.

$^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$  (ppm) 9.70 (s, 1 H), 7.64 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 7.37 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 3.89 (s, 3H).

$^{13}\text{C RMN}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$  (ppm) 191.31, 150.39, 149.11, 129.47, 129.42, 109.89, 109.08, 56.67.

### Síntesis de **7**

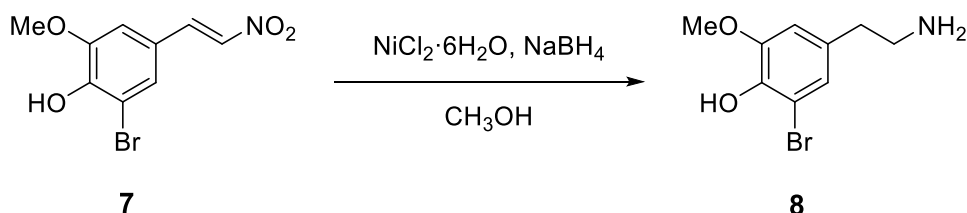


En un matraz de fondo redondo de 250 mL se disolvió **6** (200 mg, 0.87 mmol) en nitrometano 50 mL. A continuación, se añadió  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (143 mg, 1.85 mmol) y  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (145  $\mu\text{L}$ , 2.53 mmol). La mezcla se sometió a ultrasonidos a temperatura

ambiente durante 5 horas, transcurridas las cuales se concentró a vacío y se extrajo con acetato de etilo/agua. Las fracciones orgánicas se reunieron, se secaron con sulfato magnésico anhidro y se concentraron. El residuo se purificó mediante columna cromatográfica (sílica gel,  $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ , 7:3) obteniéndose el nitroderivado **7** como un sólido de color anaranjado con un rendimiento del 92 %.

$^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) 7.88 (d,  $J = 13.6$  Hz, 1H), 7.50 (d,  $J = 13.6$  Hz, 1H), 7.37 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 6.95 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 3.97 (s, 3H).

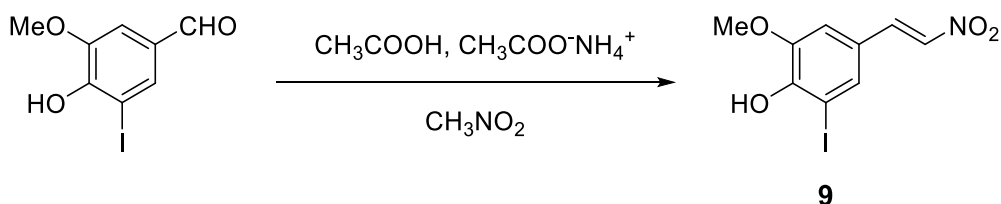
#### Síntesis de **8**



En un matraz de fondo redondo de 100 mL se disolvió  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (366 mg, 1.54 mmol) en metanol (40 mL) y se agitó hasta completa disolución. A continuación, se añadió lentamente y bajo agitación  $\text{NaBH}_4$  (175 mg, 4.62 mmol). Tras esperar 30 minutos, se adicionó **7** (480 mg, 1.76 mmol), seguido de  $\text{NaBH}_4$  (410 mg, 10.84 mmol). Una vez terminada la reacción, indicada por CCF, la mezcla de reacción se filtró a través de Celite y se lavó con metanol. Los filtrados se reunieron y se concentraron a vacío. El residuo obtenido se extrajo varias veces con acetato de etilo/agua separando las fases orgánicas. A continuación, se realizó la adición de pequeñas cantidades de  $\text{HCl}$  (1M) a la fase acuosa hasta conseguir un  $\text{pH} = 6$  y se repitió la extracción con acetato de etilo. Ambas fases orgánicas se reunieron y se extrajeron repetidas veces con una disolución de  $\text{HCl}$  (1M), descartando las fases orgánicas. Todas las fases acuosas se reunieron y se concentran a sequedad obteniéndose **8** como un sólido blanquecino con un 2% de rendimiento (8.5 mg).

**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm) 7.15 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.26 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.94 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H).

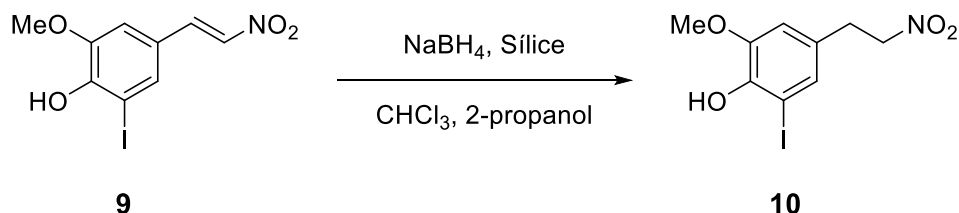
#### Síntesis de 9



En un matraz de fondo redondo de 250 mL se disolvió 5-iodovainillina (1 g, 3.59 mmol) en nitrometano 100 mL. A continuación, se añadió  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (596 mg, 7.73 mmol) y  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (576  $\mu\text{L}$ , 9.14 mmol). La mezcla se sometió a ultrasonidos a temperatura ambiente durante 5 horas. Transcurrido este tiempo, la mezcla se concentró a vacío y se extrajo con acetato de etilo/agua. Las fracciones orgánicas se reunieron, se secaron con sulfato magnésico anhidro y se concentraron. El residuo se purificó mediante columna cromatográfica (sílica gel,  $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ , 7:3) obteniéndose **9** como un sólido de color anaranjado con un rendimiento del 85 %.

**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), δ (ppm) 7.87 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H), 7.56 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H), 6.96 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H).

#### Síntesis de 10

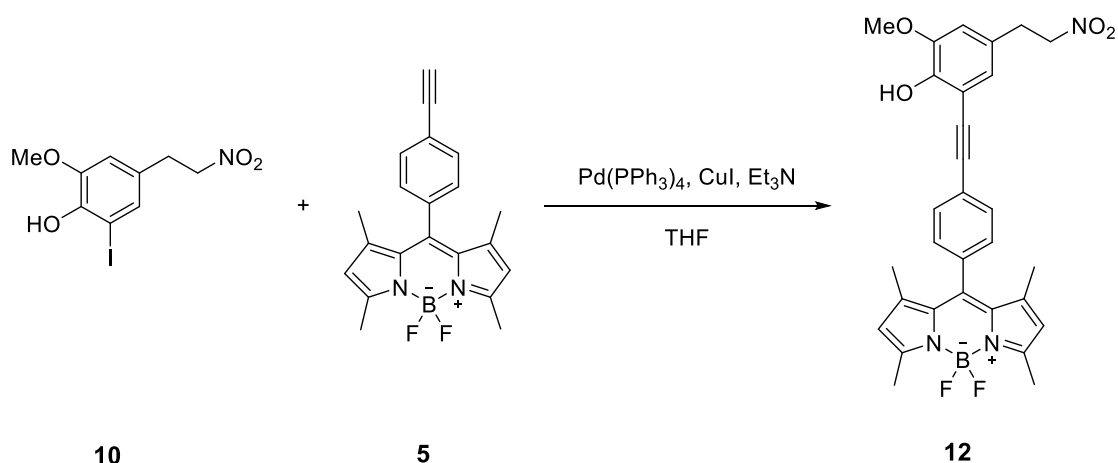


En un matraz de fondo redondo de 500 mL se disolvieron **9** (3.83 g, 12 mmol) y sílice (35.8 g, 3 g/mmol) en 300 mL de cloroformo/2-propanol (6:1). A continuación, se

añadió  $\text{NaBH}_4$  (1.8 g, 47.6 mmol) lentamente y a temperatura ambiente durante un periodo de 10 minutos. Tras 2 horas a temperatura ambiente, el exceso de  $\text{NaBH}_4$  se eliminó mediante tratamiento con 50 mL de HCl (1M) y la mezcla se filtró. El filtrado se extrajo tres veces con acetato de etilo/agua, las fases orgánicas se reunieron, se secaron con sulfato magnésico anhidro y se concentraron a sequedad obteniéndose **10** como un aceite con un rendimiento del 78 % (3.02 g).

$^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.15 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 6.66 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 4.57 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.21 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H).

### Síntesis de **12**



En un matraz de fondo redondo de 100 mL, se disolvió **10** (445 mg, 1.37 mmol),  $\text{CuI}$  (12.25 mg, 0.064 mmol) y  $\text{Pd(PPh}_3)_4$  (74.3 mg, 0.064 mmol) en 45 mL de THF seco. A continuación, se añadió  $\text{Et}_3\text{N}$  (604  $\mu\text{L}$ , 4.60 mmol) y **5** (320 mg, 0.92 mmol). La reacción se mantuvo a temperatura ambiente, bajo argón y con agitación durante 8 horas. Al terminar, el disolvente se concentró a vacío y se realizó una extracción con diclorometano/agua. Las fases orgánicas se secaron con sulfato magnésico anhidro y se concentraron. El crudo de reacción se purificó mediante columna cromatográfica (hexano/acetato de etilo, 8:2), obteniéndose **12** como un aceite de color marrón



oscuro con un rendimiento del 17% junto con los dos productos no deseados **13** (50 %) y **11** (19 %).

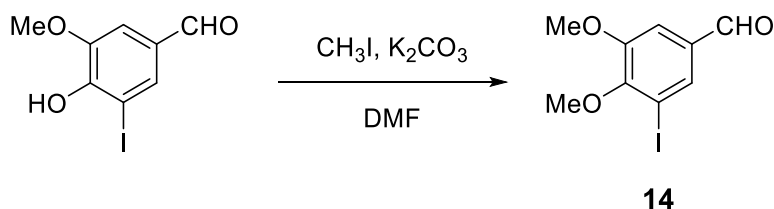
(**12**)  $^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.68 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.29 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 6.94 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 6.71 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 5.98 (s, 2H), 4.61 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.26 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.56 (s, 6H), 1.39 (s, 6H).

(**11**)  $^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.00 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.37 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.04 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1H), 5.99 (s, 2H), 4.67 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.26 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 2.55 (s, 6H), 1.44 (s, 6H).

(**13**)  $^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.62 (d,  $J = 8.5$  Hz, 4H), 7.26 (d,  $J = 8.5$  Hz, 4H), 5.98 (s, 4H), 2.54 (s, 12H), 1.39 (s, 12H).

(**13**) **HRMS** (EI):  $m/z$  (%) calculada para  $\text{C}_{42}\text{H}_{37}\text{B}_2\text{F}_4\text{N}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  es de 695.3062 y la masa  $[\text{M}+\text{H}]^+$  obtenida es de 695.3135.

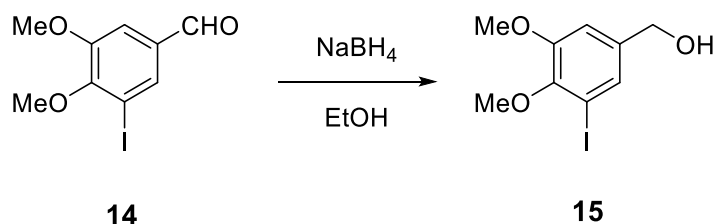
#### Síntesis de **14**



En un matraz de fondo redondo de 100 mL se disolvió 5-iodovainillina (1 g, 3.59 mmol) en 25 mL de dimetilformamida. Una vez disuelto se añadieron carbonato potásico (2.48 g, 18 mmol) y yoduro de metilo (450  $\mu\text{L}$ , 7.27 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas y posteriormente se extrajo con acetato de etilo/salmuera. Las fases orgánicas se secaron con sulfato magnésico anhidro y se concentraron, obteniéndose **14** como un aceite incoloro con un 87 % de rendimiento.

$^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 9.83 (s, 1H), 7.83 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 7.41 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.95 (s, 3H).

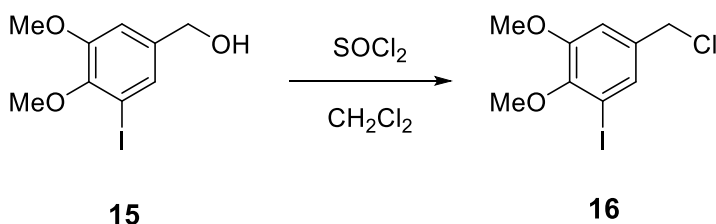
### Síntesis de 15



En un matraz de fondo redondo de 250 mL se disolvió **14** (5.82 g, 19.93 mmol) en 100 mL de etanol y se añadió lentamente borohidruro de sodio (1.13 g, 29.87 mmol). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente bajo agitación durante 3 horas, el disolvente se concentró a vacío sin aumentar mucho la temperatura y el residuo se extrajo con acetato de etilo/agua. Las fases orgánicas se reunieron, se secaron con sulfato magnésico anhidro y se concentraron dando lugar a **15** como un aceite incoloro con un 66 % de rendimiento.

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.29 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 4.56 (s, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.83 (s, 3H).

### Síntesis de 16

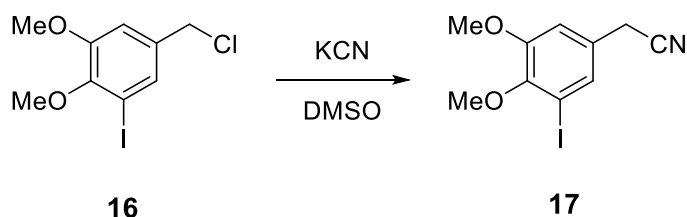


En un matraz de fondo redondo de 250 mL se disolvió **15** (3.86 g, 13.13 mmol) en 60 mL de diclorometano. La disolución se enfrió a 0 °C con un baño de agua-hielo y se añadió cloruro de tionilo (1.30 mL, 17.92 mmol). La reacción se mantuvo a temperatura ambiente bajo agitación durante 1 hora y al finalizar se extrajo con acetato de etilo/agua, las fases orgánicas se reunieron, se secaron con sulfato de

magnésico anhidro y se concentraron dando lugar a **16** como un aceite incoloro con un rendimiento del 82%.

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.36 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 6.91 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 4.48 (s, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.83 (s, 3H).

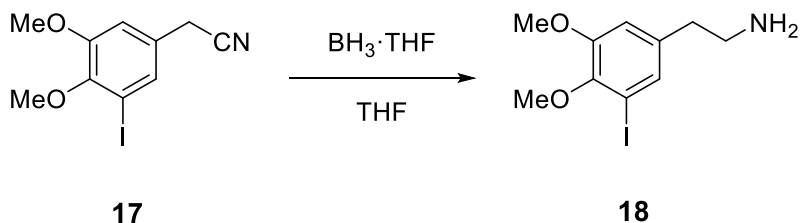
#### Síntesis de 17



En un matraz de fondo redondo de 250 mL se disolvió **16** (3.35 g, 10.74 mmol) en 25 mL de dimetilsulfóxido y se añadió cianuro potásico (839 mg, 12.88 mmol). La reacción se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente durante 12 horas y al finalizar se extrajo con éter dietílico/agua por triplicado. Las fases orgánicas se secaron con sulfato magnésico anhidro y se concentraron obteniendo **17** con un 61 % de rendimiento.

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.29 (dt,  $J_d = 2.1$  Hz,  $J_t = 0.8$  Hz, 1H), 6.84 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.67 (t,  $J = 0.8$  Hz, 2H).

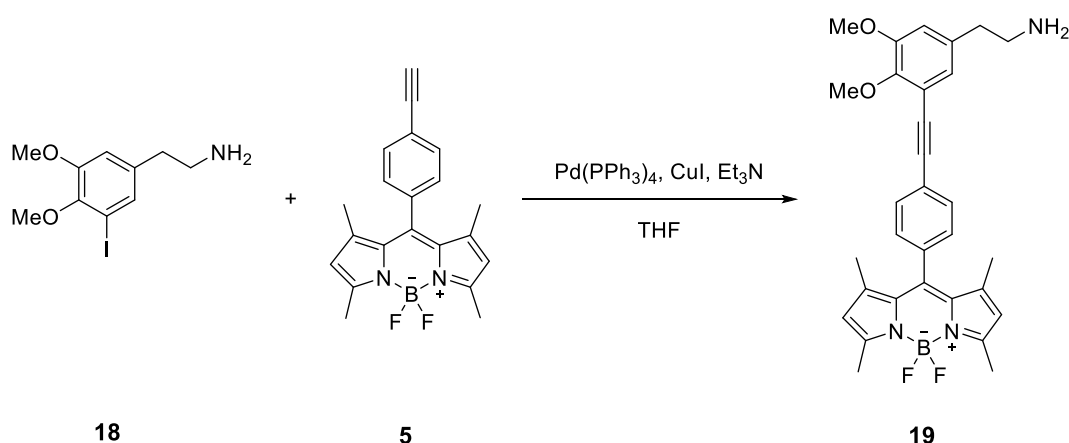
#### Síntesis de 18



En un matraz de fondo redondo de 100 mL se disolvió **17** (1 g, 3.30 mmol) en 10 mL de tetrahidrofurano seco y se añadió un complejo de borano-tetrahidrofurano (13.20 mL, 13.20 mmol). La mezcla se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. Al finalizar, se extrajo con acetato de etilo/ácido clorhídrico 1M, la fase acuosa se llevó a medio básico con hidróxido sódico y se extrajo de nuevo con acetato de etilo varias veces. Las fases orgánicas de la última extracción se reunieron, se secaron con sulfato magnésico anhidro y se concentraron obteniendo **18** como un aceite incoloro con un rendimiento del 42 %.

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.19 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 6.71 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 2.94 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 2.65 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H).

#### Síntesis de 19



En un matraz de fondo redondo de 50 mL, se disolvió **18** (185 mg, 0.60 mmol),  $\text{CuI}$  (6 mg, 0.031 mmol) y  $\text{Pd(PPh}_3)_4$  (48.7 mg, 4.2 mmol) en 20 mL de THF seco. A continuación, se añadieron  $\text{Et}_3\text{N}$  (380  $\mu\text{L}$ , 2.72 mmol) y **5** (150 mg, 0.43 mmol). La reacción se mantuvo bajo argón y con agitación a temperatura ambiente durante 6 horas. Al terminar, el disolvente se concentró a vacío y se realizó una extracción diclorometano/agua. Las fases orgánicas se secaron con sulfato magnésico anhidro y se concentraron. El crudo de reacción se purificó mediante columna cromatográfica

(inicialmente hexano/acetato de etilo 5:5, seguido de acetonitrilo y finalmente acetonitrilo/amoniaco 32%, 9:1), obteniéndose **19** como un sólido de color rojizo con un rendimiento del 17%.

**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.66 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.28 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 6.98 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 6.80 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 5.98 (s, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.07 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.81 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.55 (s, 6H), 1.43 (s, 6H).

**HRMS** (EI): m/z (%) calculada para C<sub>31</sub>H<sub>32</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> es de 528.263 y la masa [M+H]<sup>+</sup> obtenida fue de 528.261.



# **Capítulo 5. Detección colorimétrica de formaldehído mediante nanopartículas de oro funcionalizadas.**

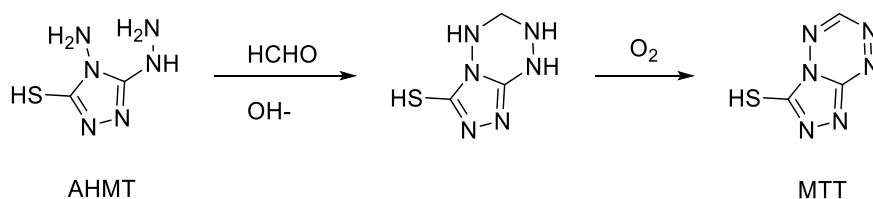




## 5.1 Introducción

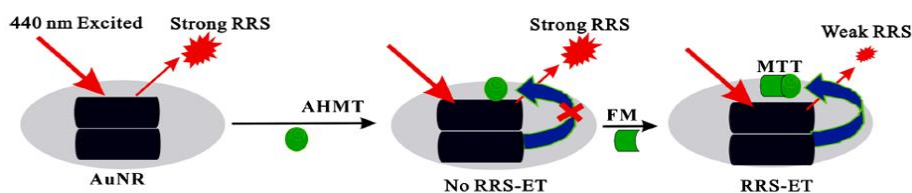
De entre los numerosos mecanismos de transducción que se pueden utilizar en el diseño de sensores o dosímetros químicos, uno de los más utilizados en los últimos años se basa en la modificación de las propiedades optoelectrónicas de nanopartículas de oro (AuNPs) adecuadamente funcionalizadas<sup>131</sup>. En la mayor parte de los casos, el proceso de detección consiste en la agregación de las nanopartículas de oro inducida por la presencia de un analito. Dicha agregación modifica la banda de resonancia del plasmón superficial de las nanopartículas con el correspondiente cambio de color en la suspensión. En concreto, el color rojo característico de las nanopartículas cuando están dispersas se vuelve azul debido a la agregación y este cambio de color es observable a simple vista incluso a muy bajas concentraciones de nanopartículas<sup>132</sup>.

Aunque existe un gran número de sensores basados en nanopartículas de oro y plata<sup>133</sup>, se encuentran pocos ejemplos en los que estos materiales hayan sido aplicados a la detección de formaldehído. Entre estos ejemplos se encuentra el publicado por Ma *et al.* en 2014. Estos autores describieron el uso del efecto SERS (*Surface-Enhanced Raman Scattering*) para la detección de formaldehído en agua y muestras de alimentos<sup>134</sup>. El efecto SERS consiste en un aumento de la difusión inelástica (señal Raman) procedente de determinadas moléculas en presencia de una nanoestructura metálica rugosa especialmente preparada. El sensor funciona mediante la derivatización del formaldehído con 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol (AHMT) para dar lugar a 6-mercapto-5-triazolo[4,3-b]-s-tetrazina (MTT, esquema 24) que puede ser cuantificado mediante SERS utilizando nanopartículas de plata como sustrato.



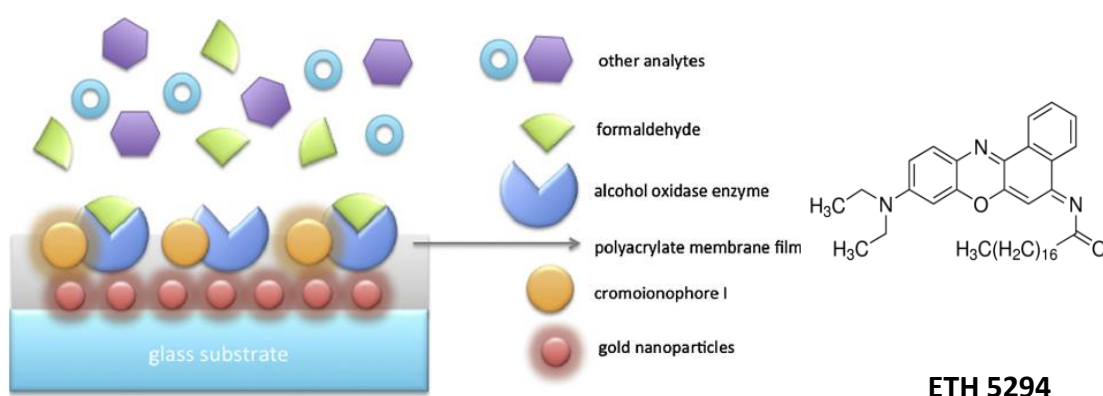
**Esquema 24.** Esquema de reacción de la derivatización del formaldehído mediante el uso de AHMT para dar lugar a MTT.

Wen *et al.*<sup>135</sup> describieron en 2015 el uso de nanobarras (*nanorods*) de oro y su característica *Resonance Rayleigh Scattering* (RRS). La señal RRS experimenta una desactivación en presencia del derivado formado entre AHMT y formaldehído (el compuesto MTT). La desactivación de la señal es debida a un proceso de transferencia energética entre el nanorod de oro que actúa como dador y el derivado de formaldehído (MTT) que actúa como aceptor (figura 26). La desactivación observada depende linealmente de la concentración de formaldehído.



**Figura 26.** Principio de detección de formaldehído mediante el uso de una transferencia energética-RRS. Imagen extraída del trabajo publicado en "*Plasmonics*, 2015, 10, 1081-1088" con permiso de la editorial.

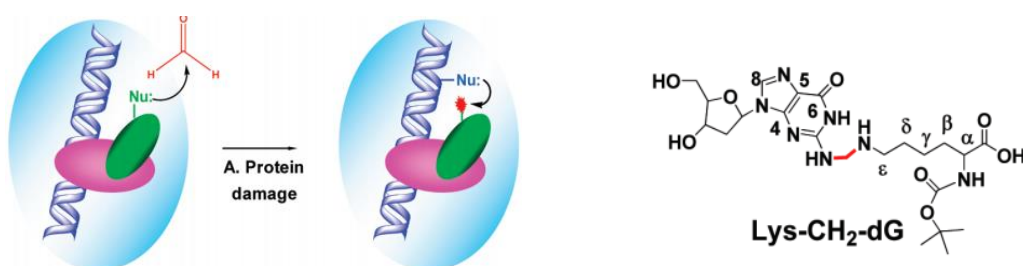
Fauzia *et al.*<sup>132</sup> publicaron en 2018 un biosensor para el reconocimiento de formaldehído basado en la combinación de nanopartículas de oro, un cromoionóforo sensible al pH y el uso de la enzima alcohol oxidasa. Esta enzima oxida al formaldehído dando lugar a protones  $\text{H}^+$  que se unen selectivamente al cromoionóforo ETH 5294. De este modo, cuantos más protones  $\text{H}^+$  se unen al cromoionóforo, más electrones son fotoexcitados de un orbital ocupado a uno vacío, provocando un oscurecimiento del biosensor. La intensidad de este cambio depende linealmente de la concentración de formaldehído (figura 27).



**Figura 27.** Diagrama del biosensor propuesto por Fauzia et al. Imagen extraída del trabajo publicado en “*Sens. Actuator B Chem.* **2018**, 257, 1128-1133” con permiso de la editorial.

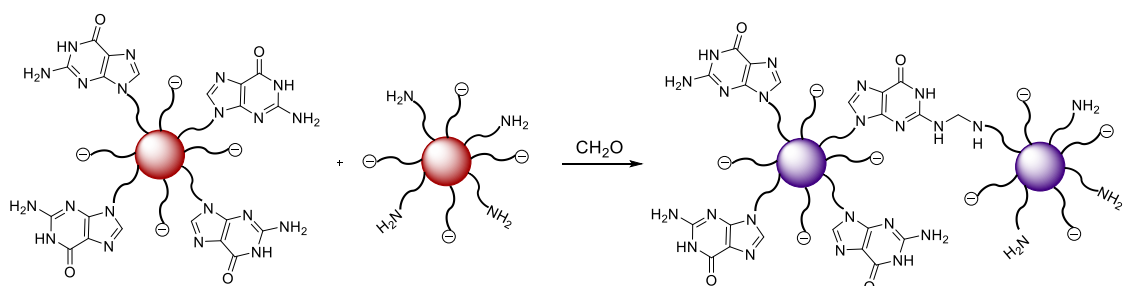
Aunque en la bibliografía aparecían algunos ejemplos del uso de nanopartículas, nanorods o superficies metálicas para la detección de formaldehído, como los que se ha comentado anteriormente, no se encontraron ejemplos que hicieran uso del proceso de agregación de nanopartículas de oro. Por esa razón se decidió explorar la utilización de este mecanismo de transducción en el diseño de nuevos sensores para el compuesto objeto de estudio.

Una vez establecido el mecanismo de transducción que se iba a utilizar, el paso siguiente fue determinar qué grupos funcionales se debían anclar a las nanopartículas de oro para que, en presencia del analito, experimentaran la agregación con el consiguiente cambio de color. La primera aproximación se basaba en imitar el proceso químico que desencadena el efecto genotóxico del formaldehído en el cuerpo humano. Este efecto se produce como consecuencia de que el formaldehído induce un entrecruzamiento entre las bases nitrogenadas del ADN y ciertas proteínas. En este sentido, James A. Swenberg *et al.* habían llevado a cabo, en 2010, un estudio<sup>136</sup> en el que caracterizaron estructuralmente las moléculas resultantes del entrecruzamiento entre desoxirribonucleótidos como desoxiadenosina (dA), desoxiguanosina (dG) y desoxicitidina (dC) y aminoácidos como lisina, cisteína, histamina y triptófano mediante su reacción con formaldehído (figura 28).



**Figura 28.** Representación del efecto genotóxico del formaldehído en el organismo y la estructura de uno de los productos de entrecruzamiento ADN-proteínas. Imagen extraída del trabajo publicado en “*J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3388-3399” con permiso de la editorial.

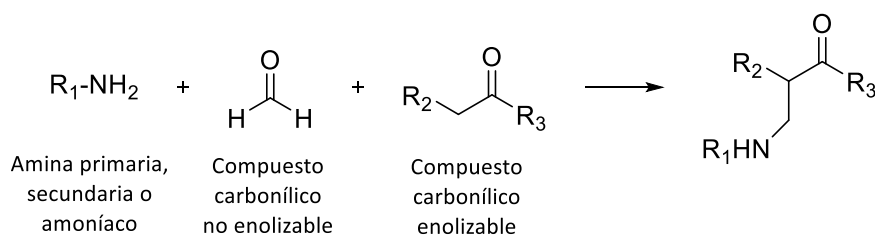
Basándonos en este hecho y en la experiencia previa del grupo en el uso de nanopartículas de oro modificadas<sup>137,138</sup>, se decidió diseñar un dosímetro formado por dos tipos de nanopartículas de oro funcionalizadas. Unas partículas estarían funcionalizadas con un simulante de guanina y las otras con alquilaminas estructuralmente semejantes a los residuos de lisina. De este modo, en presencia de formaldehído se produciría el entrecruzamiento entre ambos tipos de nanopartículas dando lugar a la agregación (esquema 25).



**Esquema 25.** Diseño dosímetro basado en nanopartículas de oro funcionalizadas con aminas y derivados de guanina para la detección de formaldehído.

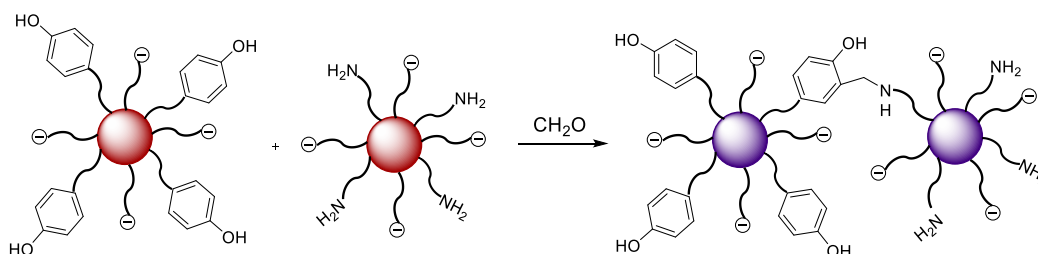
La segunda aproximación planteada para la detección de formaldehído empleando AuNPs se basó en el uso de dos variaciones de la ampliamente conocida reacción de Mannich<sup>139</sup>. Esta reacción clásicamente consta de dos etapas. En una primera etapa se produce en la adición nucleófila de una amina (primaria, secundaria o amoníaco) al grupo carbonilo de un compuesto no enolizable (en nuestro caso, formaldehído) bajo catálisis ácida, para dar lugar a la correspondiente imina o sal de

iminio en medio ácido. A continuación, la forma enólica de un compuesto carbonílico enolizable actúa como nucleófilo reaccionando con la sal de iminio formada previamente para dar un compuesto  $\beta$ -aminocarbonílico o base de Mannich. La reacción de Mannich puede esquematizarse de la siguiente manera (esquema 26).



**Esquema 26.** Esquema general de la reacción de Mannich.

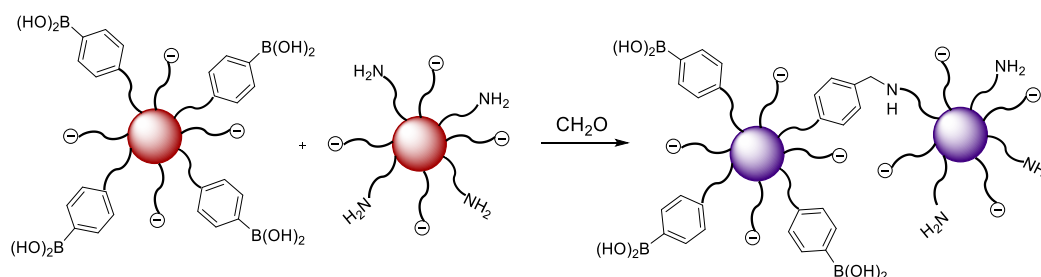
Utilizando esta reacción se plantearon dos posibles modificaciones. La primera consistió en la sustitución de la clásica cetona alifática utilizada como compuesto carbonílico enolizable por fenoles<sup>140,141</sup> (reacción de Betti<sup>142</sup>, esquema 27) o heterociclos ricos en electrones como indoles, que juegan un papel similar en el mecanismo de la reacción<sup>143</sup>.



**Esquema 27.** Diseño de un dosímetro basado en nanopartículas de oro funcionalizadas con derivados de fenol y con aminas alifáticas para la detección de formaldehído haciendo uso de la reacción de Betti.

La segunda variación de la reacción de Mannich empleada fue la sustitución del compuesto carbonílico enolizable por un ácido o ester fenilborónico (reacción de Petasis<sup>144</sup>, esquema 28) que, en presencia de formaldehído y amina, tras una serie de equilibrios complejos entre diversos intermedios de reacción, da lugar al producto de condensación de la amina mediante la formación de un enlace C-C.

## Capítulo 5. Detección colorimétrica de formaldehído mediante nanopartículas de oro funcionalizadas

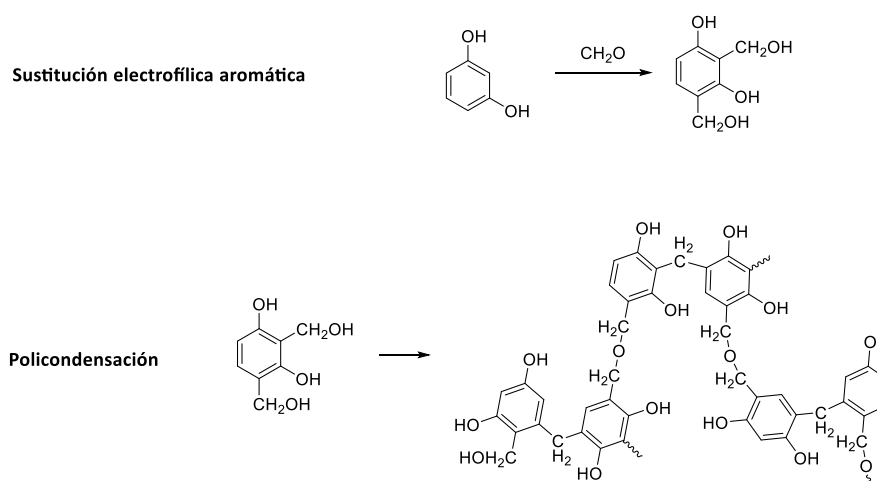


**Esquema 28.** Diseño de un dosímetro basado en nanopartículas de oro funcionalizadas para la detección de formaldehído haciendo uso de la reacción de Petasis.

Estas variaciones nos permitirían diseñar dosímetros basados en nanopartículas de oro funcionalizadas con distintas aminas y derivados fenólicos o fenilborónicos para llevar a cabo el entrecruzamiento de nanopartículas mediante la adición de formaldehído, produciendo el fenómeno de agregación y el consiguiente cambio de color.

Finalmente se planteó también una última aproximación haciendo uso de las ampliamente conocidas reacciones de polimerización entre formaldehído y ciertos compuestos fenólicos que dan lugar a resinas con grandes aplicaciones industriales. De entre todos los compuestos fenólicos capaces de producir este tipo de reacciones, el resorcinol es uno de los que requiere condiciones más suaves. Esto es debido a la presencia de dos grupos hidroxilo en su estructura, que aportan más densidad electrónica al anillo e incrementan la reactividad de las posiciones activas del mismo<sup>145</sup>. Estas propiedades permiten que el resorcinol reaccione fácilmente con formaldehído a través de un proceso sol-gel (preparación de materiales sólidos a partir de moléculas pequeñas en disolución) bajo una suave catálisis ácida o básica, dando lugar a redes poliméricas tridimensionales (esquema 29)<sup>146</sup>.

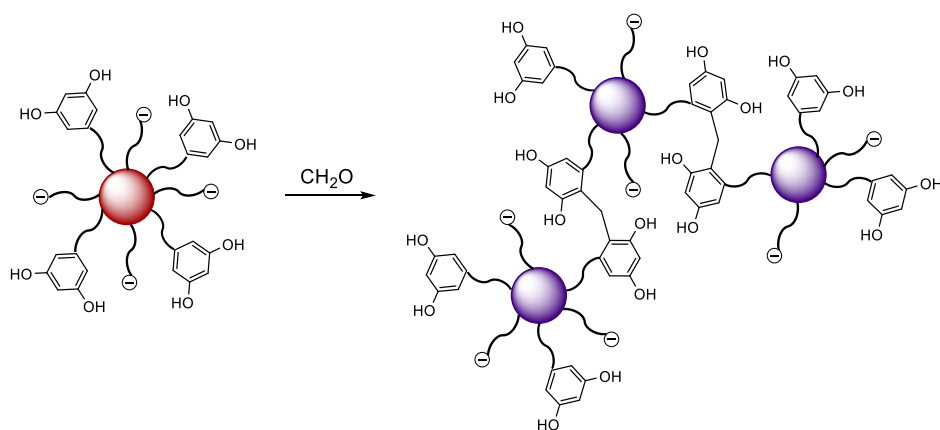
## Capítulo 5. Detección colorimétrica de formaldehído mediante nanopartículas de oro funcionalizadas



**Esquema 29.** Etapas en el proceso de polimerización entre resorcinol y formaldehído.

Tal y como se muestra en el esquema 29, el proceso de polimerización entre el resorcinol y formaldehído comprende dos etapas distintas. Una primera reacción de sustitución electrofílica aromática generalmente catalizada por un medio básico<sup>147</sup> o ácido<sup>148</sup>, que da lugar al derivado hidroximetílico (-CH<sub>2</sub>OH) del resorcinol. A continuación, sucesivas reacciones de condensación con pérdida de agua dan lugar a los correspondientes geles de resorcinol-formaldehído. Por tanto, el proceso de detección (esquema 30) consistiría en la condensación promovida por formaldehído de dos unidades de resorcinol de nanopartículas distintas<sup>149</sup>, generando un entrecruzamiento interpartícula que daría lugar a la agregación de las nanopartículas de oro, produciendo un cambio en la banda de resonancia del plasmón superficial y el correspondiente cambio de color asociado<sup>84</sup>.

## Capítulo 5. Detección colorimétrica de formaldehído mediante nanopartículas de oro funcionalizadas



**Esquema 30.** Diseño dosímetro basado en nanopartículas de oro funcionalizadas para la detección de formaldehído haciendo uso de la reacción de polimerización resorcinol-formaldehído para formar geles.



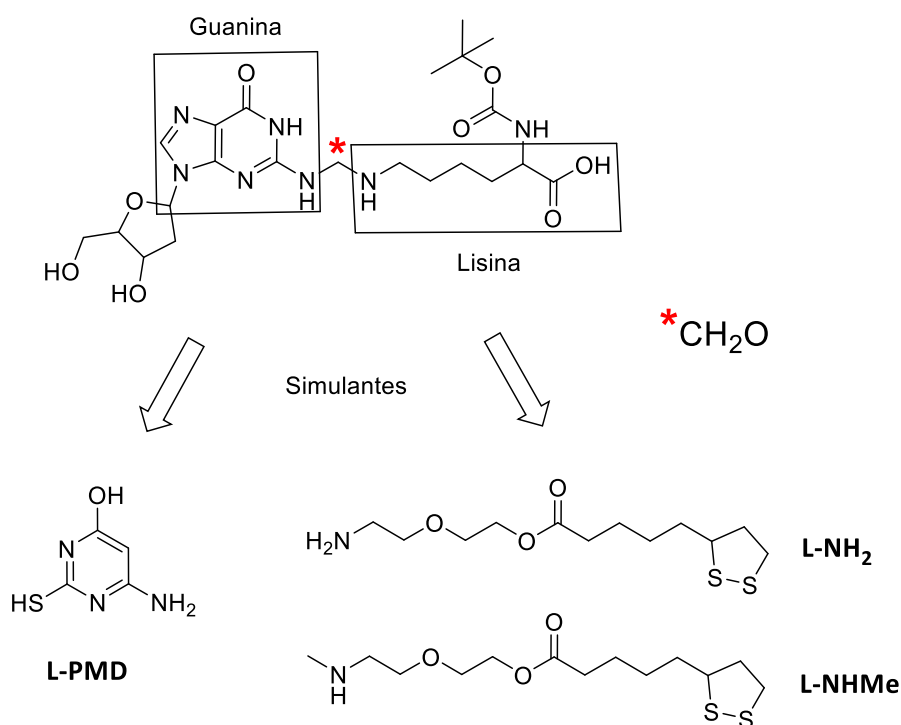
## 5.2 Resultados y discusión

Ya que el uso de nanopartículas de oro era común a todas las aproximaciones planteadas, la primera fase del trabajo consistió en la preparación de dichas nanopartículas. Para ello se empleó el método de Turkevich-Frens que reduce el ácido tetracloroáurico con citrato de sodio en agua a ebullición<sup>150</sup>. El empleo de este método permitió la obtención de nanopartículas de oro monodispersas de un tamaño aproximado entre 10 y 20 nm, así como una concentración alrededor de  $10^{-9}$  M como se determinó mediante TEM y medidas de espectroscopia UV-visible. Una vez obtenidas las nanopartículas de oro, se funcionalizaron desplazando el citrato de la superficie de las mismas mediante una reacción de intercambio con el ligando deseado en cada caso, dando lugar así a los potenciales dosímetros. En general para el anclaje de ligandos a nanopartículas de oro es común hacer uso de la gran afinidad que el azufre tiene por el oro. Por ello, todas las moléculas reactivas usadas se funcionalizaron en uno de sus extremos con grupos tiol o disulfuro.

### 5.2.1. Empleo de nanopartículas de oro funcionalizadas con un simulante de guanina y aminas para la detección colorimétrica de formaldehído.

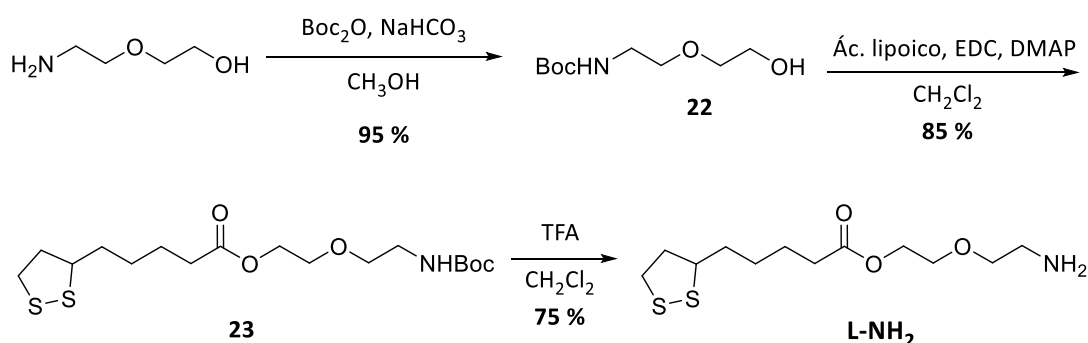
Para la primera aproximación, basada en la imitación del efecto genotóxico del formaldehído en el organismo, se utilizó el 4-amino-6-hidroxi-2-mercaptopirimidina monohidrato (**L-PMD**) simulando la estructura y reactividad de la guanina, mientras que para sustituir al residuo de lisina, se emplearon los ésteres obtenidos por reacción entre el ácido lipoico y 2-(2-aminoetoxi)etanol (**L-NH<sub>2</sub>**). Con el objetivo de evaluar si existía un efecto significativo en la reactividad que aumentase el rendimiento de la reacción al sustituir la amina primaria por una secundaria también se sintetizó en compuesto N-metilado (**L-NHMe**) (esquema 31). Todos los ligandos contienen átomos

de azufre, uno de ellos formando un grupo tiol y el otro un puente disulfuro que facilitan la unión a las nanopartículas de oro en la etapa de funcionalización debido a la mayor afinidad de los átomos de oro por los de azufre que por los átomos de oxígeno del citrato utilizado en la síntesis de las nanopartículas de oro<sup>151,152</sup>.



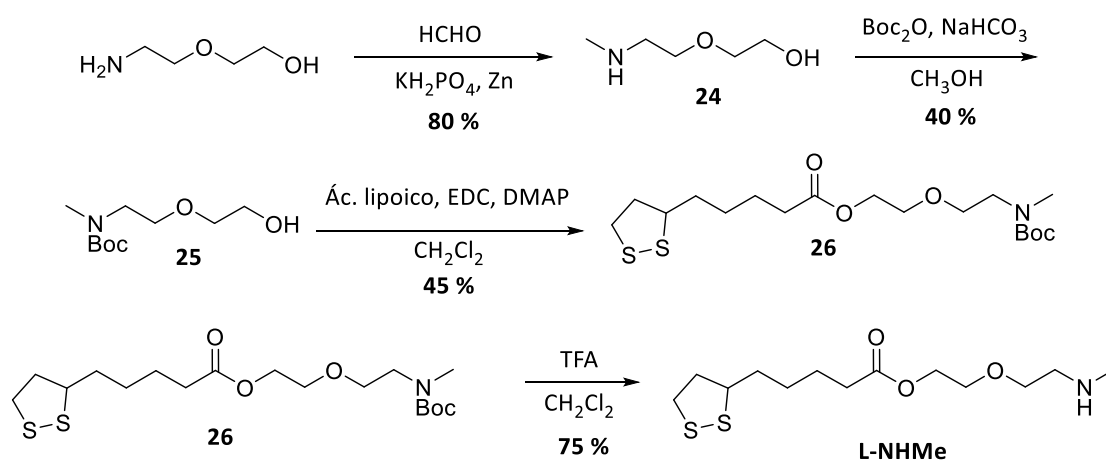
**Esquema 31.** Esquema de los simulantes empleados para la imitación del efecto genotóxico del formaldehído en el organismo.

Mientras que **L-PMD** estaba disponible comercialmente, **L-NH<sub>2</sub>** y **L-NHMe** fueron preparados a través de una síntesis por etapas. Para la obtención de **L-NH<sub>2</sub>**, la primera reacción consistió en la protección del grupo amino del 2-(2-aminoetoxy)etanol mediante el dicarbonato de diterc-butilo (Boc<sub>2</sub>O) para posteriormente realizar una esterificación entre el grupo hidroxilo libre y el ácido lipoico utilizando EDC y DMAP como agentes de acoplamiento. Por último, se llevó a cabo la desprotección del grupo amino con ácido trifluoroacético (esquema 32).



**Esquema 32.** Etapas de reacción utilizadas para la síntesis de **L-NH<sub>2</sub>**.

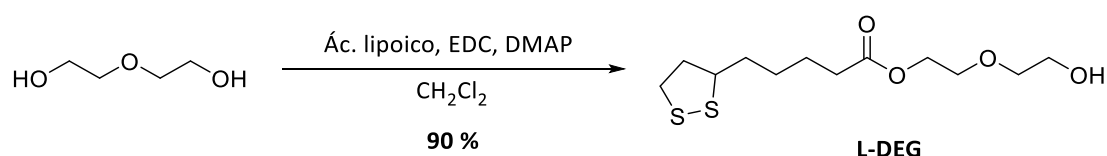
Para la síntesis de **L-NHMe** se introdujo una etapa previa de metilación del grupo amino utilizando formaldehído en presencia de un agente reductor. La protección del grupo amino empleando  $\text{Boc}_2\text{O}$  seguido de esterificación con ácido lipoico mediante EDC y DMAP como agentes de acoplamiento y desprotección con ácido trifluoroacético como en el caso anterior permitió obtener el ligando deseado (esquema 33).



**Esquema 33.** Ruta sintética ligando **L-NHMe**.

Tras obtener los ligandos, se procedió a funcionalizar con ellos las nanopartículas de oro. Debido a que los grupos amino terminal de **L-NH<sub>2</sub>** y **L-NHMe** inducían la rápida agregación de las nanopartículas debido al establecimiento de una red de puentes de hidrógeno entre las mismas, fue necesario añadir un ligando que actuara como estabilizante. Es ampliamente conocido que la funcionalización de la

superficie de las nanopartículas de oro con derivados de polietilenglicol (una molécula muy hidrofílica) permite la estabilización estérica de las suspensiones de las nanopartículas en soluciones acuosas<sup>153</sup>. Teniendo en cuenta este hecho, en nuestro caso se empleó dietilenglicol esterificado con ácido lipoico (**L-DEG**, esquema 34).



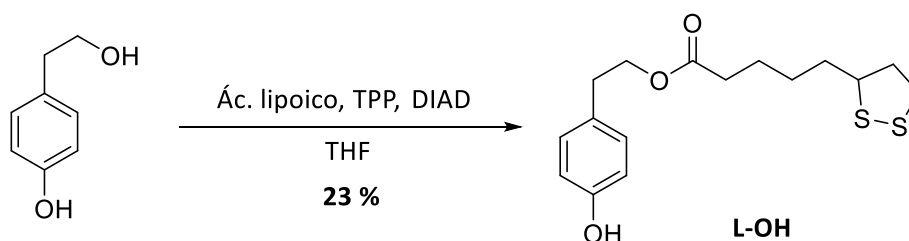
Esquema 34. Síntesis de **L-DEG**.

Así la funcionalización de las nanopartículas se llevó a cabo, finalmente, por tratamiento de la suspensión de las nanopartículas de oro estabilizadas con citrato con una mezcla 3/1 de **L-DEG** y los ligandos **L-NH<sub>2</sub>** o **L-NHMe**, obteniendo las correspondientes nanopartículas de oro funcionalizadas **AuNP-NH<sub>2</sub>** y **AuNP-NHMe**. La preparación de las nanopartículas **AuNP-PMD** se llevó a cabo directamente por tratamiento de las nanopartículas de oro estabilizadas con citrato con **L-PMD**, a través de por una reacción de intercambio de ligando. La mezcla de **AuNP-PMD** y **AuNP-NH<sub>2</sub>** o **AuNP-NHMe**, condujo a la preparación de los dos primeros dosímetros.

Una vez obtenidos, se evaluó su capacidad para la detección colorimétrica de formaldehído, estudiando, si tras la adición del analito, se producía un fenómeno de agregación en la suspensión de nanopartículas, con el consiguiente cambio de color de rojo a azul, que fuese observable a simple vista. Para llevar a cabo estos experimentos se mezclaron en cada caso volúmenes iguales de **AuNP-PMD** y **AuNP-NH<sub>2</sub>** o **AuNP-NHMe** respectivamente. A cada una de estas mezclas se le añadió formalina (50 mM) y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 12-15 minutos. Transcurrido este tiempo no se observó ningún tipo de respuesta, manteniéndose las nanopartículas inalteradas.

### 5.2.2. Empleo de nanopartículas de oro funcionalizadas con un derivado del fenol y aminas para la detección colorimétrica de formaldehído.

Para la segunda aproximación, basada en la modificación de la reacción de Mannich empleando fenoles como sustituto del compuesto carbonílico enolizable, se utilizó 4-(2-hidroxietil)fenol cuyo grupo alcohol alifático fue esterificado con ácido lipoico (para el anclaje sobre el oro) empleando trifenilfosfina (TPP) y azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD) como agentes de acoplamiento (**L-OH**, esquema 35). Por otro lado, se emplearon los ligandos **L-NH<sub>2</sub>** y **L-NHMe** previamente sintetizados como aminas primaria y secundaria respectivamente.



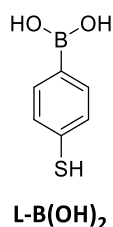
Esquema 35. Síntesis de **L-OH**.

La funcionalización de las nanopartículas de oro con los derivados de fenol (**AuNP-OH**) se llevó a cabo mediante el tratamiento de la disolución madre de nanopartículas estabilizadas con citrato con una mezcla 3/1 de ácido lipoico (**L-TA**, para mantener estable la suspensión de nanopartículas en agua) y ligando **L-OH**. Los correspondientes dosímetros para formaldehído se obtuvieron mezclando volúmenes iguales de las disoluciones de **AuNP-OH** y de **AuNP-NH<sub>2</sub>** o **AuNP-NHMe**.

Una vez preparados estos dosímetros, se evaluó de nuevo su capacidad para la detección colorimétrica de formaldehído. Así, a cada una de estas mezclas se le añadió formalina (50 mM) y se mantuvo a temperatura ambiente durante 12-15 minutos. Desafortunadamente, tampoco en este caso se observó ningún cambio apreciable en el sistema.

### 5.2.3. Empleo de nanopartículas de oro funcionalizadas con un derivado del ácido fenilborónico y aminas para la detección colorimétrica de formaldehído.

Para la variación de la reacción de Mannich, en la que se sustituye el compuesto carbonílico enolizable por un ácido o ester borónico, se decidió utilizar el ácido 4-mercaptofenil borónico (**L-B(OH)<sub>2</sub>**, figura 29) que posee un grupo tiol para su anclaje sobre la superficie de oro y los ligandos con grupos amino anteriormente preparados **L-NH<sub>2</sub>** y **L-NHMe**.



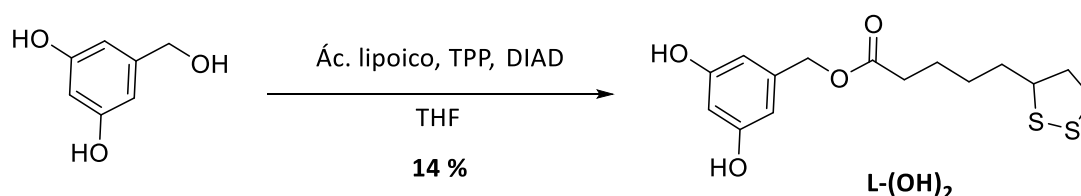
**Figura 29.** Estructura L-B(OH)<sub>2</sub>

La funcionalización de las nanopartículas de oro con **L-B(OH)<sub>2</sub>** se realizó directamente mediante una reacción de sustitución de ligando a partir de las nanopartículas estabilizadas con citrato, obteniéndose las correspondientes nanopartículas (**AuNP-B(OH)<sub>2</sub>**). Los dosímetros para formaldehído se obtuvieron mezclando volúmenes iguales de las disoluciones de **AuNP-B(OH)<sub>2</sub>** y **AuNP-NH<sub>2</sub>** o **AuNP-NHMe**.

Una vez obtenidos, se evaluó su capacidad para la detección colorimétrica de formaldehído. Para ello, se mezclaron en cada caso volúmenes iguales de **AuNP-B(OH)<sub>2</sub>** con **AuNP-NH<sub>2</sub>** o **AuNP-NHMe** respectivamente. A cada una de estas mezclas se le añadió formalina (50 mM) y se mantuvo a temperatura ambiente durante 12-15 minutos. La presencia del analito tampoco indujo cambios en el sistema.

#### 5.2.4. Empleo de nanopartículas de oro funcionalizadas con un derivado de resorcinol y aminas para la detección colorimétrica de formaldehído.

Para la cuarta y última aproximación a la detección de formaldehído empleando nanopartículas de oro funcionalizadas, basada en la reacción de polimerización entre resorcinol y formaldehído, se utilizó como molécula reactiva para el anclaje sobre la superficie del oro 5-(hidroximetil)resorcinol esterificado con ácido lipoico (**L-(OH)<sub>2</sub>**, esquema 36). La esterificación se llevó a cabo con un rendimiento del 14 %, empleando TPP y DIAD como agentes de acoplamiento<sup>154</sup>.



Esquema 36. Síntesis de **L-(OH)<sub>2</sub>**.

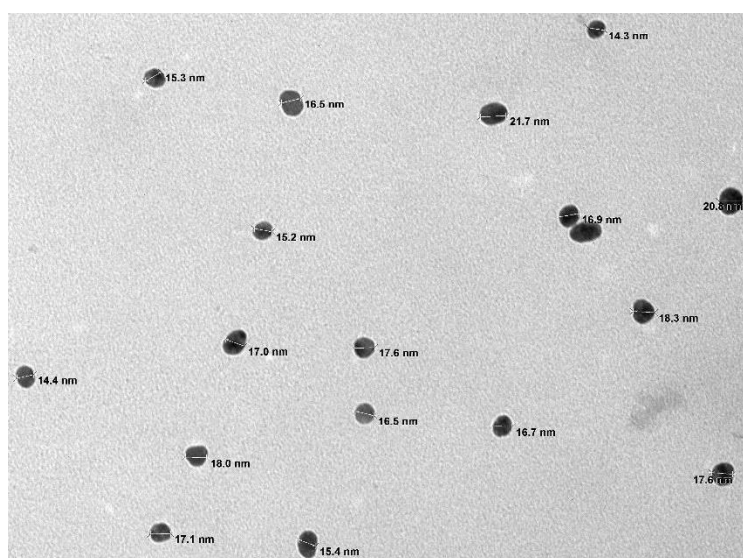
La funcionalización de las nanopartículas se efectuó mediante el tratamiento de la suspensión de nanopartículas estabilizadas con citrato con una mezcla 3/1 de ácido lipoico (**L-TA**, para mantener estable la suspensión de nanopartículas en agua) y ligando **L-(OH)<sub>2</sub>**, obteniéndose las correspondientes nanopartículas de oro funcionalizadas con dicho ligando (**AuNP-(OH)<sub>2</sub>**).

Una vez obtenidas las correspondientes nanopartículas, se evaluaron sus capacidades para la detección colorimétrica de formaldehído, tanto solas como mezcladas con las nanopartículas aminadas obtenidas anteriormente. Así se prepararon tres sondas, una de ellas contenía únicamente **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** y las otras dos fueron preparadas mezclando en cada caso volúmenes iguales de **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** con **AuNP-NH<sub>2</sub>** o **AuNP-NHMe** respectivamente. A cada una de estas mezclas se le añadió formalina (50 mM) y la suspensión se mantuvo a temperatura ambiente durante 12-15 minutos. Tras este tiempo, se observó para **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** un gran cambio en el color de la dispersión de rojo a azul, indicando una agregación de las nanopartículas. Sin

embargo, para las mezclas con las aminas, el cambio de color de la dispersión fue menor.

Debido a los buenos resultados obtenidos con **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** y formaldehído sin necesidad de añadir las nanopartículas aminadas **AuNP-NH<sub>2</sub>** o **AuNP-NHMe**, se decidió centrar el estudio en esta sonda y evaluar de forma exhaustiva su capacidad como sensor de formaldehído. El primer paso en este estudio fue caracterizar perfectamente las nanopartículas **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** para lo que se utilizó la microscopía de transmisión electrónica (TEM), dispersión dinámica de la luz (DLS) y espectroscopía UV-visible e infrarroja (IR).

La microscopía electrónica de transmisión se empleó para determinar la forma, el grado de dispersión y el tamaño medio de **AuNP-(OH)<sub>2</sub>**. En las imágenes de TEM obtenidas se observaron las nanopartículas de oro dispersas con una geometría esférica y un tamaño medio de 17 nm, como puede apreciarse en la figura 30.



**Figura 30.** Imagen de TEM de AuNP-(OH)<sub>2</sub>.

La suspensión acuosa color rojo vino de **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** presentó la típica banda de resonancia del plasmón superficial en el espectro UV-visible a 525 nm (gráfica 17). A partir de la medida de la absorbancia a dicha longitud de onda en el espectro de UV-visible y considerando un coeficiente de extinción molar  $\epsilon = 2.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  se



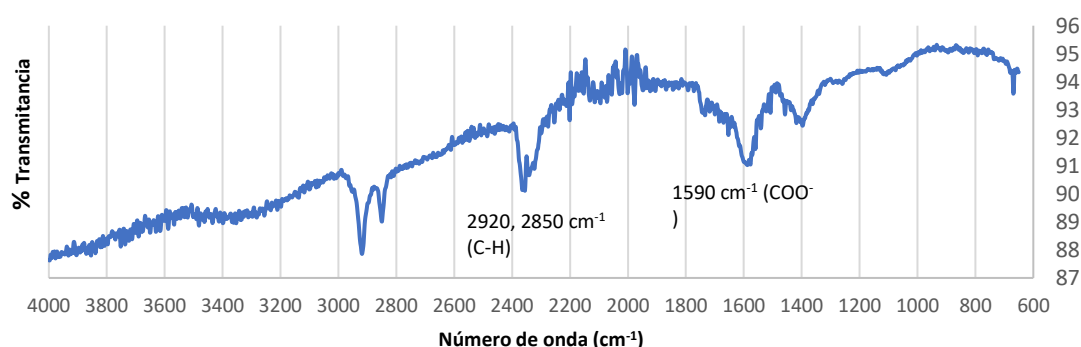
determinó una concentración inicial para **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** de  $2.56 \times 10^{-9}$  M aproximadamente. El coeficiente de extinción molar se obtuvo gracias al trabajo descrito por Qun Huo *et al.*<sup>150</sup> en el que los autores establecieron experimentalmente una dependencia lineal entre el logaritmo de  $\epsilon$  y el diámetro de la nanopartícula (d):

$$\ln \epsilon = k \cdot \ln d + c$$

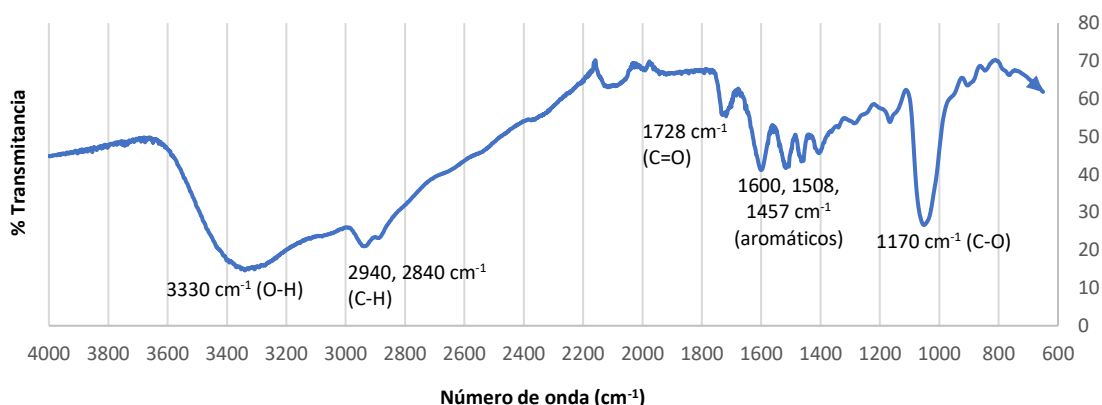
Donde  $k = 3.32$  y  $c = 10.8$ .

Con el objetivo de comprobar la funcionalización de las nanopartículas de oro, se realizó el espectro de IR de **AuNP-(OH)<sub>2</sub>**. Como puede observarse en la gráfica 16, para las nanopartículas estabilizadas con citrato (a) se observa una banda a  $1590 \text{ cm}^{-1}$  que podemos asociar a la vibración C-O del grupo carboxilato y la ausencia de una banda ancha por encima de  $3000 \text{ cm}^{-1}$  característica de los enlaces O-H. En el caso de **AuNP-(OH)<sub>2</sub>**, aparecen tres bandas principales a  $3340$ ,  $1728$  y  $1600\text{-}1400 \text{ cm}^{-1}$  que asociamos a los grupos hidroxilo, el grupo carbonilo y los anillos aromáticos respectivamente. Estos resultados permiten confirmar la funcionalización de las nanopartículas de oro.

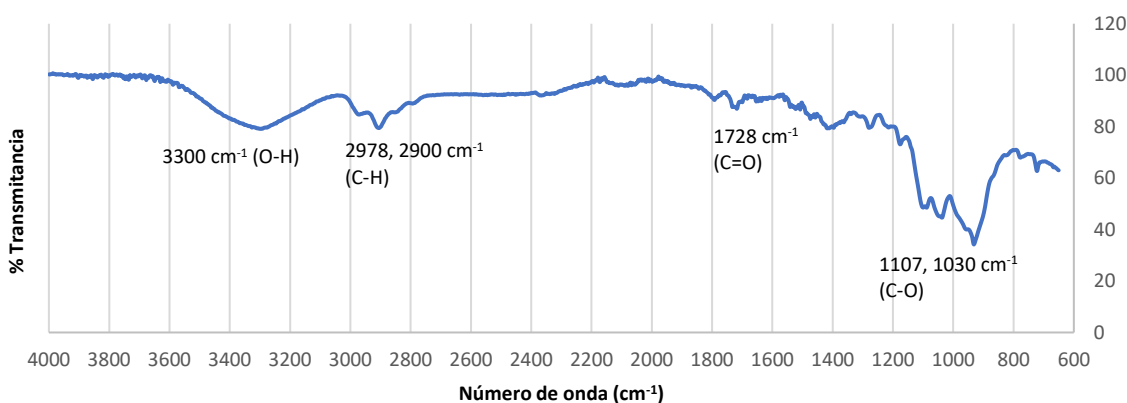
(A)



B)



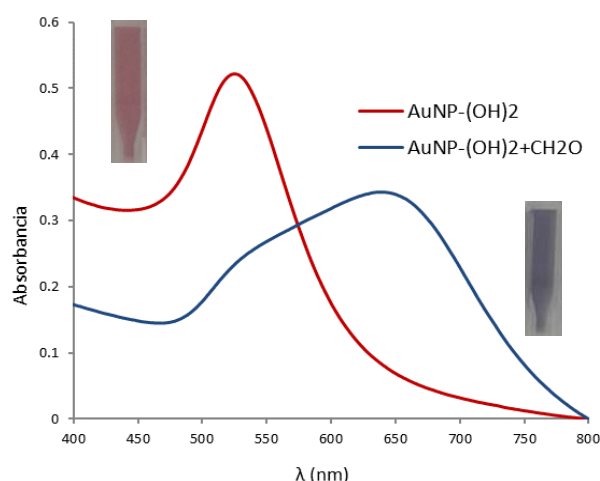
(C)



**Gráfica 16.** Espectros de infrarrojo de (a) las nanopartículas de oro estabilizadas con citrato; (b) AuNP-(OH)<sub>2</sub> y (c) AuNP-(OH)<sub>2</sub> en presencia de formaldehído.

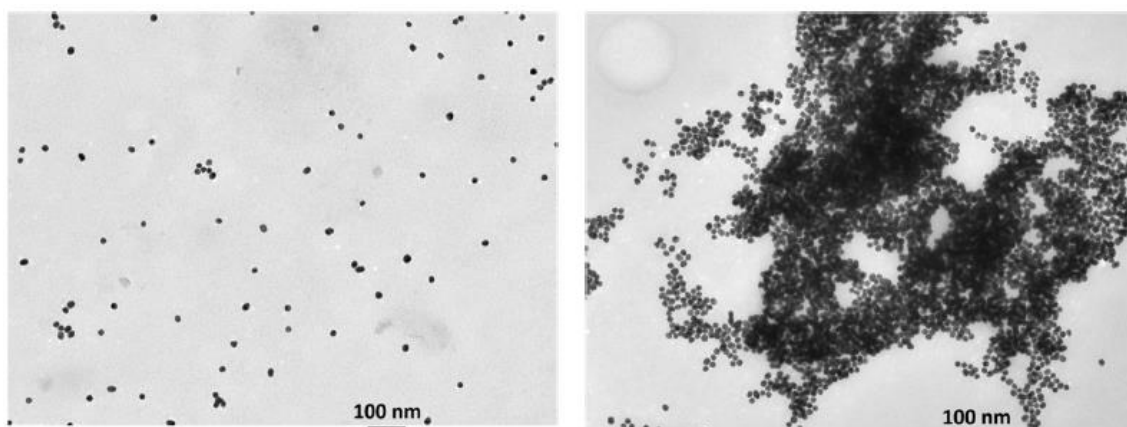
Una vez caracterizado el dosímetro, se pasó a cuantificar la respuesta colorimétrica observada en presencia de formaldehído. Para ello, se registró el espectro de UV-visible de **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** en ausencia y presencia de un exceso de formalina a temperatura ambiente. En ausencia del analito se observó una suspensión de color rojizo con un máximo de absorción a 525 nm, que tras añadir formalina (50 mM) y tras un tiempo de reacción entre 12 y 15 minutos, cambió gradualmente a azul oscuro, desapareciendo la banda de absorción inicial y apareciendo otra banda a 645 nm, longitud onda característica de nanopartículas de oro agregadas (gráfica 17).

## Capítulo 5. Detección colorimétrica de formaldehído mediante nanopartículas de oro funcionalizadas



**Gráfica 17.** Espectro de UV-visible de  $\text{AuNP}-(\text{OH})_2$  en agua a temperatura ambiente, en ausencia y presencia de un exceso de formalina (50 mM).

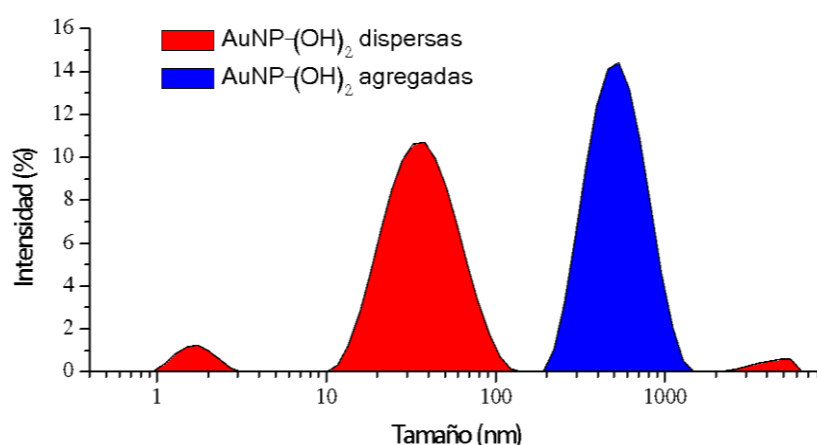
Los resultados obtenidos en esta primera prueba concuerdan con la reacción de condensación esperada entre los diferentes residuos de resorcinol y formaldehído en la superficie de las nanopartículas de oro. Este proceso de agregación se confirmó haciendo uso de diversas técnicas. Así, en las imágenes de TEM, se observó un aumento significativo en la agregación de  $\text{AuNP}-(\text{OH})_2$  tras la adición de formalina (50 mM, figura 31).



**Figura 31.** Imágenes de TEM de  $\text{AuNP}-(\text{OH})_2$  en ausencia (izquierda) y en presencia (derecha) de formaldehído.

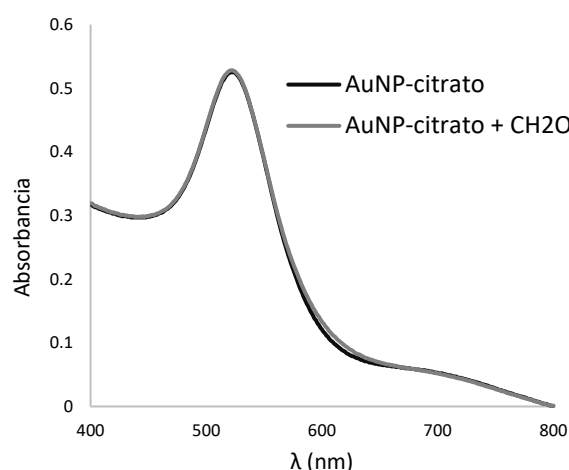
Por otra parte, las medidas de DLS mostraban un incremento en el radio hidrodinámico de las nanopartículas (gráfica 18). Las medidas se llevaron a cabo con

**AuNP-(OH)<sub>2</sub>** (500  $\mu$ L) en disolución acuosa tamponada (Tris-HCl, 10 mM, pH 7; más adelante se comentará que esta mezcla tamponante es la que condujo a los mejores resultados) en ausencia y en presencia de 500  $\mu$ L formaldehído (20 mM). Los resultados obtenidos están expresados mediante la distribución de tamaño por intensidad, dando lugar a un tamaño medio de 37.8 y 531 nm para **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** dispersas y agregadas respectivamente. Estos resultados confirman de nuevo el fenómeno de agregación inducido por sucesivas reacciones de polimerización lo que justificaría el aumento del radio hidrodinámico de las nanopartículas al exponerlas a formaldehído.



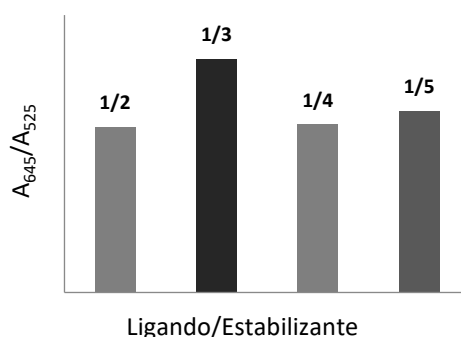
**Gráfica 18.** Medidas de dispersión dinámica de la luz (DLS) de AuNP-(OH)<sub>2</sub> en disolución acuosa tamponada (Tris-HCl, pH 7) en ausencia y en presencia de formaldehído expresadas mediante distribución del tamaño por intensidad.

Paralelamente, se realizó un experimento de control bajo las mismas condiciones utilizando nanopartículas de oro estabilizadas únicamente con citrato con el objetivo de descartar la posibilidad de que trazas de estas nanopartículas pudieran estar reaccionando con formaldehído dando lugar a falsos positivos. Para ello, se añadieron 100  $\mu$ L de formaldehído (50 mM) a 100  $\mu$ L de nanopartículas estabilizadas con citrato y tras 15 minutos de reacción se registró el espectro de UV-visible (gráfica 19). En estas condiciones no se observó una variación significativa en el espectro de UV-visible, confirmando que el proceso de agregación observado era debido a la reacción entre **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** y formaldehído.



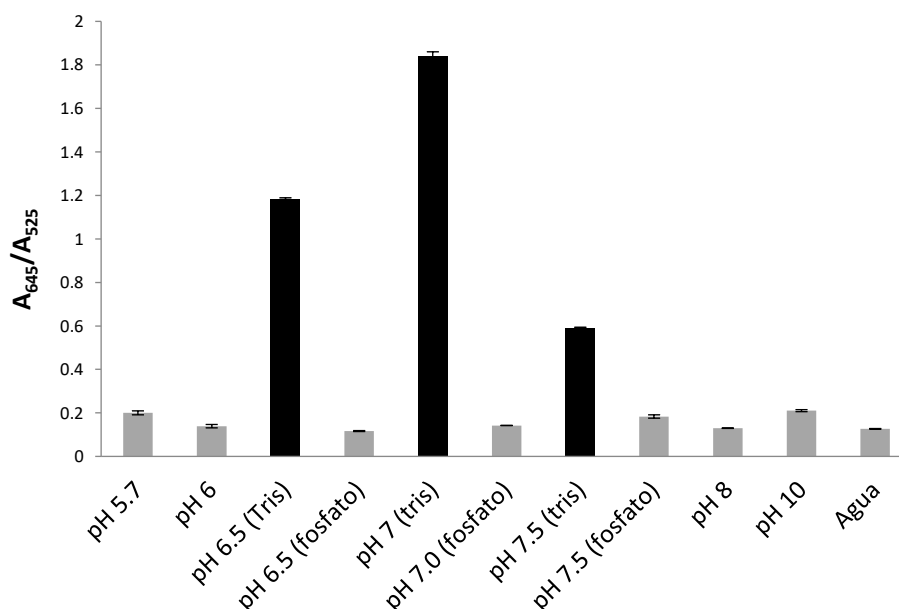
**Gráfica 19.** Espectro de UV-visible de las nanopartículas estabilizadas con citrato (suspendidas en agua) en ausencia y en presencia de formaldehído (50 mM).

Para determinar el ratio molar ligando **L-(OH)<sub>2</sub>/L-TA** que permitiera tanto la correcta estabilización de las nanopartículas en suspensión como la mayor sensibilidad frente a formaldehído, se realizó el estudio de la respuesta de distintas mezclas, determinando que la relación 1/3 era la que daba lugar a un mejor conjunto de propiedades. Para llevar a cabo estos experimentos, se prepararon nanopartículas de oro funcionalizadas (100  $\mu$ L) con distintos ratios ligando/estabilizante (desde 1/2 a 1/5) y se evaluó la respuesta frente a formaldehído (100  $\mu$ L de formalina 20 mM) de cada uno de ellos, empleando el mismo protocolo de medida en todos los casos. En la gráfica 20 se muestra la relación de absorbancias a 645 y 525 nm para las distintas proporciones empleadas.



**Gráfica 20.** Respuesta del dosímetro frente a formaldehído para distintos ratios ligando/estabilizante.

Como se ha descrito anteriormente, el proceso de detección se basa en una reacción de polimerización cuyo rendimiento se ve afectado por el pH del medio<sup>155</sup>. Por tanto, se decidió estudiar el efecto del pH en la respuesta del dosímetro, evaluando los cambios en el espectro de UV-visible para cada medio. Para ello, diversas alícuotas de **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** se centrifugaron y redisolieron en distintos tampones (fosfato, tris-HCl y carbonato) a diferentes valores de pH (desde 5.7 a 10) y se hicieron reaccionar con formalina (10 mM) durante diez minutos a temperatura ambiente. La mayor respuesta se obtuvo con el tampón tris-HCl a pH 7 (gráfica 21).



**Gráfica 21.** Respuesta de AuNP-(OH)<sub>2</sub> frente a formaldehído (20 mM) en distintas disoluciones tamponadas y a diferentes valores de pH (tampón fosfato para los valores de pH 5.7, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0; tampón tris-HCl para los valores de pH 6.5, 7.0, y 7.5; tampón carbonato para pH 10).

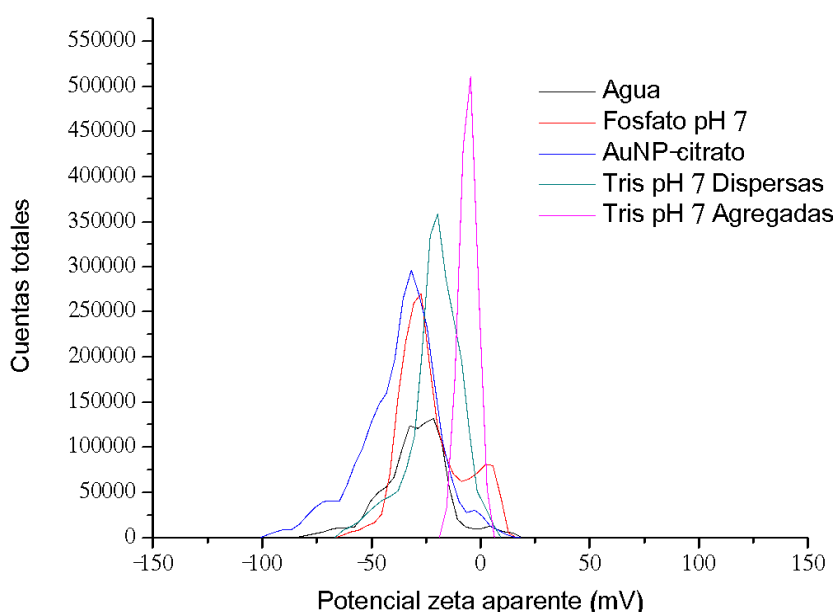
Las experiencias realizadas anteriormente parecían indicar que las características del compuesto usado para preparar el tampón tenían una marcada influencia en los resultados obtenidos. Así, se observaba que para un mismo valor de pH la agregación producida en el tampón tris era mucho mayor que la correspondiente al mismo pH pero usando tampón fosfato. Por otra parte, también se comprobaba que el efecto de los cambios de pH sobre el proceso de agregación era mucho más acusado

en el caso de emplear tampón tris que en el caso de que fuera fosfato. Teniendo en cuenta este comportamiento se planteó la posibilidad de que el tampón tris desestabilizara la suspensión de las nanopartículas estando, en ese caso, el efecto de agregación sobredimensionado con relación a la concentración del analito presente.

Para intentar clarificar los resultados obtenidos, se decidió determinar cualitativamente la estabilidad relativa de las dispersiones de **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** en distintos medios. Para ello, se procedió a medir el valor de potencial zeta para distintas disoluciones. Si se consideran las nanopartículas de oro como partículas cargadas negativamente y se utiliza el modelo de doble capa eléctrica para representar el entorno iónico existente en la proximidad de una partícula cargada, el potencial zeta se puede relacionar con el potencial necesario para penetrar la capa iónica existente y desestabilizar la partícula. Atendiendo a esto, un valor de potencial zeta más negativo indica una mayor estabilidad de la suspensión. Los primeros estudios se llevaron a cabo con las nanopartículas suspendidas a pH 7 en los dos tampones empleados, tris y fosfato. Los valores de potencial zeta obtenidos para estas dos suspensiones fueron -20.0 mV y -26.9 mV para el tampón tris y el tampón fosfato respectivamente (gráfica 22). Estos datos indican que hay una mayor inestabilidad en las suspensiones en tris que en las de fosfato lo que explicaría las diferencias a las que se ha aludido anteriormente.

Haciendo uso de la misma técnica se compararon los valores obtenidos para las distintas suspensiones de **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** con las suspensiones de las nanopartículas funcionalizadas únicamente con citrato para comprobar si la presencia de los grupos funcionales correspondientes al resorcinol y el ácido lipoico contribuían a la desestabilización de las suspensiones. El valor de potencial zeta determinado para estas nanopartículas fue -31.9 mV lo que parece indicar que en efecto los grupos funcionales por sí mismo hacen que las suspensiones sean más inestables. Este efecto podría ser explicado por la posibilidad de enlaces de hidrógeno que presentan los grupos hidroxilos. Sin embargo, esta disminución en el potencial zeta está muy lejos de

la que se observa cuando el analito está presente en el medio (-4.3 mV) y produce la agregación de las nanopartículas. A pesar de que como se ha comentado anteriormente, el tampón tris desestabiliza ligeramente las suspensiones de **AuNP-(OH)<sub>2</sub>**, estas permanecen estables durante más de dos semanas a temperatura ambiente y no se observan cambios significativos en la banda de resonancia del plasmón superficial a 525 nm.



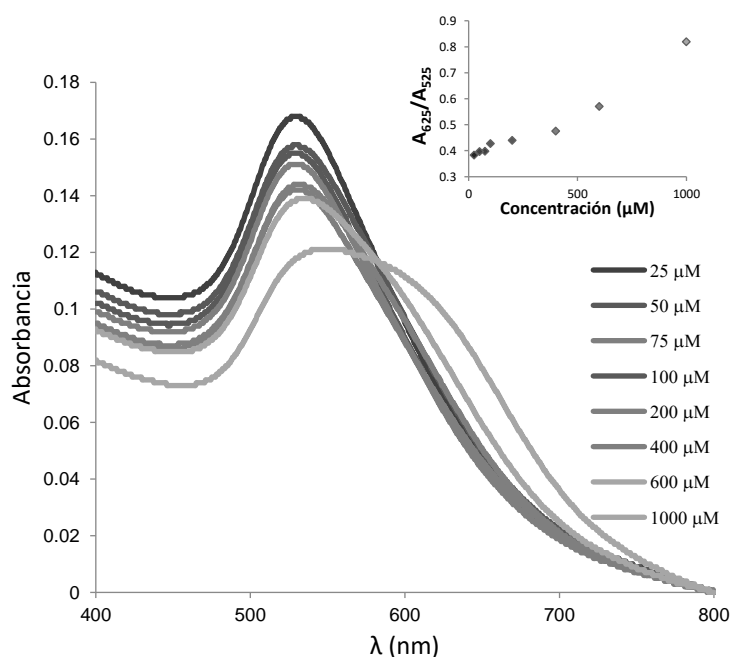
**Gráfica 22.** Medidas de potencial zeta de AuNP-(OH)<sub>2</sub> en agua (-21.4 mV), tampón fosfato pH 7 (-26.9 mV), tampón tris-HCl pH 7 (-20.0 mV), en presencia de formaldehído con tampón tris-HCl pH 7 (-4.3) y nanopartículas de oro estabilizadas con citrato en agua miliQ (-31.9 mV).

Los últimos factores que se evaluaron fueron la temperatura y el tiempo de reacción y se observó una mayor respuesta al llevar a cabo los experimentos a 38°C con un tiempo de reacción de 15 minutos.

Una vez establecidas las condiciones óptimas para llevar a cabo la reacción de detección, se decidió evaluar la concentración mínima de formaldehído que podía ser detectada por la sonda y determinar el límite de detección. Para ello, se registró el espectro de UV-visible de la suspensión acuosa de **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** (tris-HCl, 10



mM, pH 7) tras reaccionar con cantidades crecientes de formalina durante 15 minutos a 38°C (gráfica 23).



**Gráfica 23.** Espectro de UV-visible de AuNP-(OH)<sub>2</sub> (10<sup>-9</sup> M, en tris-HCl 0.01 M, pH 7) en presencia de cantidades decrecientes de formalina. Gráfica insertada: Representación del ratio de absorción ( $A_{645}/A_{525}$ ) frente a la concentración de formaldehído.

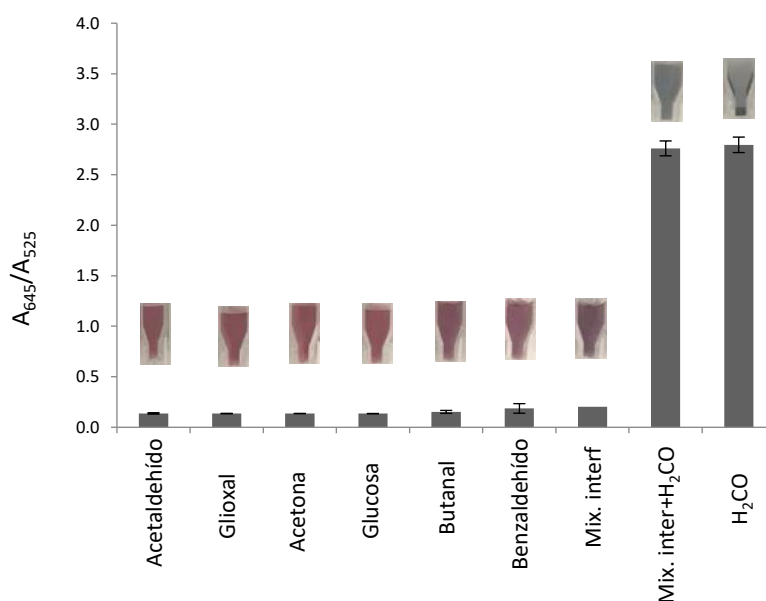
Bajo estas condiciones, los espectros de UV-visible mostraron, como era de esperar, una disminución gradual en la banda de resonancia del plasmón superficial a 525 nm junto con un aumento de la banda a 645 nm (característica de las nanopartículas de oro agregadas) a medida que aumentaba la concentración de formaldehído. Como se observa en la figura 32, estos cambios espectrales fueron acompañados de un cambio en el color en la suspensión de nanopartículas desde un color rojizo inicial hasta azul oscuro. Teniendo en cuenta este cambio de color, se estableció un límite de detección visual (concentración mínima de formaldehído para un cambio de color observable a simple vista) de 0.4 mM (12 ppm) aproximadamente.



**Figura 32.** Cambios de color en la suspensión de **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** (Tris-HCl 0.01 M, pH 7) en presencia de cantidades crecientes de formaldehído (de izquierda a derecha, 0  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 400  $\mu$ M, 600  $\mu$ M, 1 mM y 10 mM).

Por otra parte, como se observa en la gráfica insertada de la gráfica 23, la relación entre la absorción a 645 nm y la absorción a 525 nm ( $A_{645}/A_{525}$ ) muestra una dependencia lineal con la concentración de formaldehído en el rango comprendido entre 25 y 1000  $\mu$ M. Empleando estos datos y mediante la fórmula:  $LdD = 3 S_{b1}/S$ , donde  $S_{b1}$  es la desviación estándar del blanco y  $S$  la pendiente de la gráfica de la relación de absorbancias frente a la concentración de formaldehído, se calculó un límite de detección de 17  $\mu$ M (0.5 ppm).

Una vez determinado el límite de detección de la sonda, se llevó a cabo el correspondiente estudio de interferentes, con el objetivo de establecer la selectividad de dicho método. Para ello, se evaluó la respuesta colorimétrica de **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** en presencia de un gran exceso de otros interferentes comunes (100 mM) como acetona, acetaldehído, glioxal, butanal, benzaldehído o glucosa empleando el mismo protocolo de medida descrito anteriormente. Como puede verse en la gráfica 24, tanto la variación en el ratio de absorbancias  $A_{645}/A_{525}$  como los cambios de color asociados son prácticamente inapreciables para cualquier interferente incluso para la mezcla de todos ellos. Así mismo, se realizó un experimento competitivo donde **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** se trató con formaldehído en presencia de una mezcla de todos los interferentes anteriores. Como puede observarse en la gráfica 18, en este último caso, se produjo el cambio de color esperado correspondiente a la agregación de las nanopartículas.



**Gráfica 24.** Cambios de color y respuesta UV-visible de **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** en presencia de los interferentes estudiados (100 mM) y una mezcla de todos ellos con formaldehído (se realizó dos replicas para cada experimento).

Una vez comprobada la sensibilidad y selectividad del dosímetro frente a formaldehído en disolución, se decidió extender el estudio y aplicar el sistema a la detección de formaldehído en fase gas. Para ello, se introdujo un vial que contenía la suspensión del dosímetro **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** en un recipiente cerrado con aproximadamente 500 ppm de formaldehído gas en su interior, que se había generado empleando el equilibrio liquido-gas de disoluciones diluidas de formalina atendiendo a la ley de Henry<sup>115</sup>. Tras 20 minutos de exposición al gas a temperatura ambiente, se observó un claro cambio de color de rojo a azul en la suspensión de **AuNP-(OH)<sub>2</sub>**, indicando la agregación del sistema. Paralelamente se realizó un experimento control, en el que se introdujo el vial con el dosímetro **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** en el mismo recipiente anterior durante 20 minutos, pero en ausencia de formaldehído. Como puede observarse en la figura 33, en ausencia de formaldehído el dosímetro no mostró ningún cambio de color.



(A) (B)

**Figura 33.** Suspensión de **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** en ausencia (A) y en presencia (B) de formaldehído gas (500 ppm).

Tras comprobar la capacidad del sistema para llevar a cabo la detección de formaldehído en fase gas a partir de formalina comercial, se decidió estudiar su aplicabilidad con muestras reales como fuente de formaldehído gas.

Las muestras utilizadas fueron tableros comerciales de distinto tipos, suministrados por el Instituto Tecnológico Metalmecánico, Mueble, Madera, Embalaje y Afines (AIDIMME, Valencia, España) (figura 34). Se utilizaron cuatro tipos distintos de tableros, un tablero de fibras (FB 35 mm) y tres tableros de partículas (PB 27 mm, PB 16 mm Y PB 10 mm) cuyo contenido en formaldehído, determinado por el propio instituto mediante el método de extracción denominado “perforador” según la norma UNE-EN ISO 12460-5:2016, era de 5.4, 4.0, 4.5 y 6.2 mg de formaldehído por cada 100 gramos de tablero respectivamente.



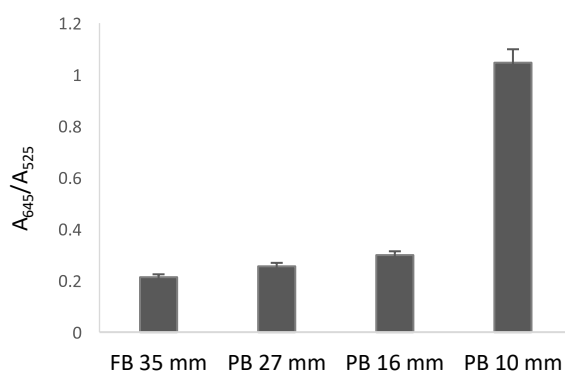
**Figura 34.** Imagen de los tableros proporcionados por AIDIMME (de izquierda a derecha PB 27 mm, PB 10 mm, PB 16 mm y FB 35 mm).

Los experimentos de detección de formaldehído se llevaron a cabo, empleando las condiciones establecidas previamente, situando un vial abierto con las nanopartículas **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** dentro de un recipiente cerrado conteniendo 15 g de tablero durante 15 horas a temperatura ambiente (en este caso se requirió un tiempo de exposición más prolongado debido a la lenta emisión de formaldehído por parte de los tableros, figura 35).



**Figura 35.** Montaje para la detección de formaldehído gas a partir de tableros comerciales.

Tras este tiempo, se registró el espectro de UV-visible para cada suspensión y se representó el ratio  $A_{645}/A_{525}$  para cada tipo de tablero, obteniendo los resultados mostrados en la gráfica 24.



**Gráfica 24.** Comparación de la respuesta de  $\text{AuNP-(OH)}_2$  ( $A_{645}/A_{525}$ ) para los diferentes tipos de tableros (fibras y partículas). Las medidas fueron realizadas por duplicado.

Los resultados obtenidos muestran que el tablero de fibras presenta una emisión de formaldehído menor que la observada para los tableros de partículas, incluso teniendo estos un menor contenido en formaldehído. Fijándonos en los distintos tipos de tableros de partículas, observamos que aquellos que poseen un mayor contenido en formaldehído dan lugar a una mayor respuesta por parte de  **$\text{AuNP-(OH)}_2$** .

### 5.3 Conclusiones

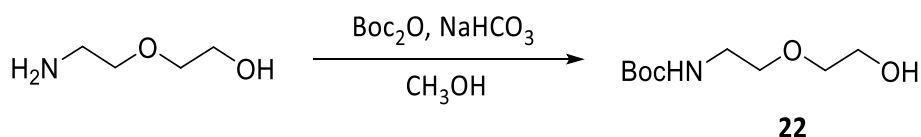
Como resumen de este capítulo se puede indicar que se ha sintetizado un dosímetro basado en nanopartículas de oro funcionalizadas con residuos de resorcinol (**AuNP-(OH)<sub>2</sub>**) para la detección colorimétrica de formaldehído tanto en disolución como en fase gas. El proceso de detección se basa en sucesivas reacciones de condensación y polimerización entre los residuos de resorcinol de la superficie de las distintas nanopartículas de oro y el formaldehído, desencadenando la agregación de las nanopartículas dispersas, produciendo un desplazamiento batocrómico de la banda de resonancia del plasmón superficial en el espectro de UV-visible con el correspondiente cambio de color asociado en la suspensión de **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** de rojo a azul, que se puede observar a simple vista. Se ha observado un aumento remarcable de la respuesta del dosímetro frente a formaldehído en presencia de tampón Tris-HCl. El dosímetro **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** es capaz de detectar formaldehído en disolución con un LdD de 0.5 ppm, así como formaldehído gas emitido por distintos tipos de tablero, dando cualitativamente una señal mayor con los tableros de partículas de mayor contenido en formaldehído.

## 5.4 Parte experimental

### Procedimientos generales

Todos los reactivos utilizados están disponibles comercialmente y han sido usados sin una purificación previa. Los disolventes secos empleados se prepararon mediante destilación sobre Na y benzofenona (THF), sobre  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) o mediante el empleo de tamiz molecular recién activado (el resto de los disolventes) antes de su uso. Todas las disoluciones acuosas utilizadas con las nanopartículas de oro fueron preparadas con agua MiliQ ( $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ). Para las cromatografías en capa fina se utilizó gel de sílice 60  $\text{F}_{254}$  (Merck) y para las columnas cromatográficas, gel de sílice 60 ( $40\text{-}63 \text{ }\mu\text{m}$ , Merck). Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón fueron registrados en un espectrómetro Bruker DPX300 300 MHz. Los espectros de UV-visible fueron realizados en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2101PC. Los espectros de infrarrojo (FT-IR) se registraron en un espectrómetro Agilent Cary 630 FT-IR. Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se obtuvieron con un microscopio JEOL JEM-1010, trabajando a 100 kV. Para los análisis de dispersión dinámica de la luz (DLS) y determinación del potencial zeta se utilizó un equipo Malvern Instruments Zetasizer ZS.

### Síntesis de 22

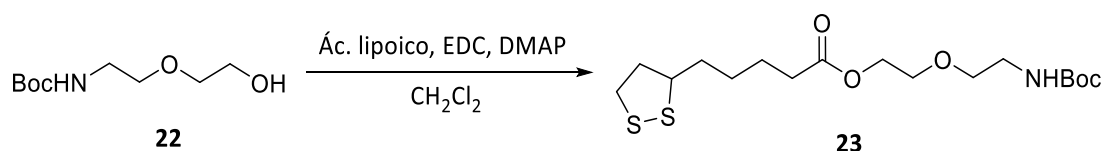


En un matraz de tres bocas, de fondo redondo y 500 mL se añadió 2-(2-aminoetoxi)etanol (2.51 mL, 25.0 mmol) disuelto en 200 mL de metanol. A continuación, se agregó dicarbonato de di-terc-butilo (5.74 mL, 25.0 mmol) y  $\text{NaHCO}_3$  (4.20 g, 50.0 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. Tras

este tiempo, la mezcla de reacción se filtró y se evaporó el disolvente. El residuo se disolvió en agua desionizada, se acidificó hasta pH 2 con hidrogenosulfato potásico y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato magnésico anhidro y tras filtrar el sólido y concentrar el disolvente, se obtuvo el producto **22** en forma de aceite incoloro con un rendimiento del 95% (4.83 g), que fue utilizado sin más purificación en la siguiente etapa de la reacción.

$^1\text{H RMN}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 3.70 (m, 2H), 3.49-3.55 (m, 4H), 3.29 (m, 2H), 1.41 (s, 9H).

### Síntesis de **23**

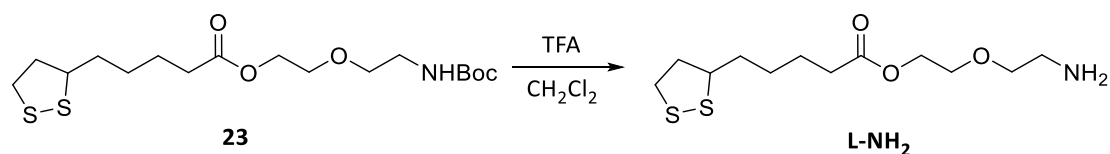


En un matraz de tres bocas, de fondo redondo y 250 mL se añadió **22** (4.83 g, 23.5 mmol) disuelto en 150 mL de diclorometano. A continuación, se agregó ácido lipoico (5.10 g, 24.7 mmol), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (4.74 g, 24.7 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (cantidad catalítica) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. Tras este tiempo, se añadió agua desionizada y se separó la fase orgánica. Dicha fase se lavó con carbonato sódico (10%) y posteriormente con salmuera. La fase orgánica, se secó sobre sulfato magnésico anhidro, se filtró y se concentró dando lugar a **23** como un líquido amarillo con un rendimiento del 85% (7.85 g).

$^1\text{H RMN}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 4.20 (m, 2H), 3.64 (m, 2H), 3.50-3.58 (m, 3H), 3.30 (m, 2H), 3.05-3.20 (m, 2H), 2.39-2.50 (m, 1H), 2.34 (t,  $J=7.4$  Hz, 2H), 1.83-1.94 (m, 1H), 1.62-1.72 (m, 4H), 1.44-1.49 (m, 2H), 1.43 (s, 9H).



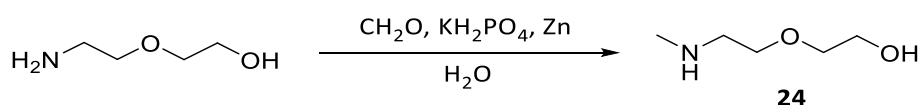
### Síntesis de L-NH<sub>2</sub>



En un matraz de dos bocas, de fondo redondo se añadió **23** (1.50 g, 3.80 mmol) disuelto en una mezcla diclorometano-ácido trifluoroacético (9:1, 100 mL, 117.5 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. A continuación, se evaporó el disolvente y el residuo se disolvió en hidróxido sódico 1M y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó con agua, se secó con sulfato magnésico anhidro, se filtró y se concentró el disolvente obteniendo **L-NH<sub>2</sub>** como un aceite amarillento con un rendimiento del 75 % (0.83 g).

<sup>1</sup>H RMN (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 4.22 (m, 2H), 3.66 (m, 2H), 3.53-3.59 (m, 1H), 3.52 (t, J= 5.4 Hz, 2H), 3.06-3.22 (m, 2H), 2.88 (t, J= 5.4 Hz, 2H), 2.40-2.51 (m, 1H), 2.35 (t, J=7.4 Hz, 2H), 1.84-1.96 (m, 1H), 1.61-1.73 (m, 4H), 1.43-1.53 (m, 2H).

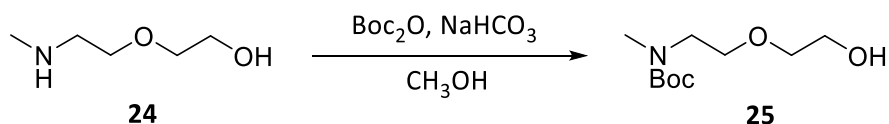
### Síntesis de 24



En un matraz de fondo redondo de 250 mL se añadió 2-(2-aminoetoxi)etanol (3.00 mL, 30.0 mmol) disuelto en 30 mL de agua desionizada. A continuación, se agregó formaldehído acuoso (36%, 3.34 mL, 42 mmol), dihidrogenofosfato potásico (8.14 g, 60.0 mmol) y zinc en polvo (3.91 g, 60.0 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Tras este tiempo, se filtró la mezcla, se extrajo con acetato de etilo y se concentró obteniendo el producto **24** en forma de aceite incoloro con un rendimiento del 80 %.

$^1\text{H RMN}$  (300MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$  (ppm) = 3.45-3.56 (m, 6H), 2.43 (t,  $J$ = 5.7 Hz, 2H), 2.19 (s, 3H).

#### Síntesis de 25



En un matraz de tres bocas, de fondo redondo y 500 mL se añadió **24** (1.17 g, 9.8 mmol) disuelto en 245 mL de metanol. A continuación, se agregó dicarbonato de di-terc-butilo (2.25 mL, 9.8 mmol) e hidrogenocarbonato sódico (1.65 g, 19.6 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. Tras este tiempo, se filtró y se evaporó el disolvente. Al residuo obtenido se le añadió agua desionizada, se acidificó hasta pH 2 con hidrogenosulfato potásico y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato magnésico anhidro y tras filtrar el sólido y concentrar el disolvente, se obtuvo el producto **25** en forma de aceite incoloro con un rendimiento del 40% (0.86 g).

$^1\text{H RMN}$  (300MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$  (ppm) = 3.44-3.60 (m, 6H), 3.34 (t,  $J$ = 5.7 Hz, 2H), 2.85 (s, 3H), 1.42 (s, 9H).

#### Síntesis de 26

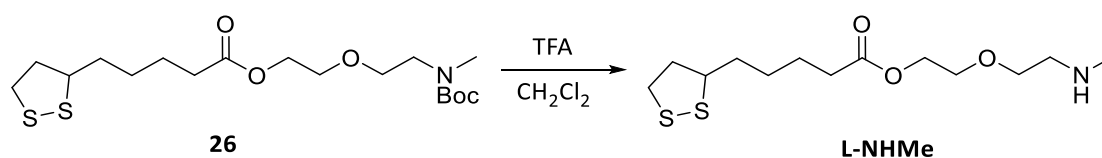


En un matraz de 250 mL de tres bocas de fondo redondo, se añadió **25** (0.62 g, 2.8 mmol) disuelto en 100 mL de diclorometano. A continuación, se agregó ácido lipoico (0.61 g, 3.0 mmol), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (0.57 g, 3.0

mmol) y 4-dimetilaminopiridina (cantidad catalítica) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. Tras este tiempo, se añadió agua desionizada y se separó la fase orgánica. Dicha fase se lavó con carbonato sódico (10%) y posteriormente con salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y se concentró dando lugar a **26** como un líquido amarillo con un rendimiento del 45%.

$^1\text{H RMN}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 4.21 (m, 2H), 3.64 (m, 2H), 3.51-3.61 (m, 3H), 3.38 (m, 2H), 3.06-3.22 (m, 2H), 2.90 (s, 3H), 2.40-2.51 (m, 1H), 2.34 (t,  $J=7.4$  Hz, 2H), 1.84-1.96 (m, 1H), 1.61-1.72 (m, 4H), 1.45-1.52 (m, 2H), 1.45 (s, 9H).

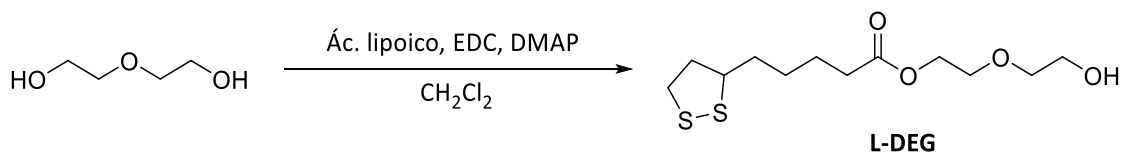
#### Síntesis de L-NHMe



En un matraz de dos bocas, de fondo redondo se añadió **26** (0.45 g, 1.1 mmol) disuelto en una mezcla diclorometano (1.2 mL) y ácido trifluoroacético (10.8 mL, 15.2 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. A continuación, se evaporó el disolvente y el residuo se disolvió en hidróxido sódico 1 M y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó con agua, se secó con sulfato magnésico anhidro, se filtró y se concentró el disolvente obteniendo **L-NHMe** como un aceite amarillento con un rendimiento del 75 %.

$^1\text{H RMN}$  (300MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) = 4.23 (m, 2H), 3.65-3.70 (m, 2H), 3.52-3.63 (m, 3H), 3.06-3.22 (m, 2H), 2.78 (t,  $J= 5.4$  Hz, 2H), 2.43-2.52 (m, 1H), 2.43 (s, 3H), 2.36 (t,  $J=7.3$  Hz, 2H), 1.84-1.95 (m, 1H), 1.59-1.72 (m, 4H), 1.41-1.53 (m, 2H).

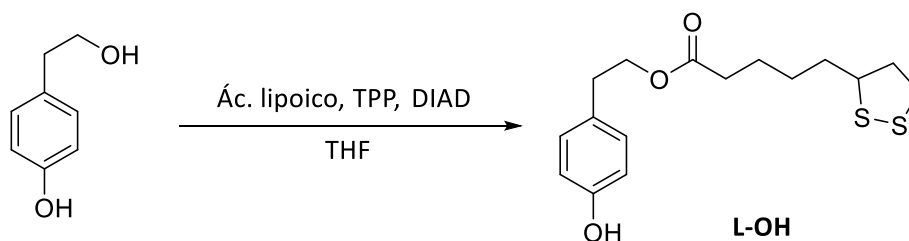
### Síntesis de L-DEG



En un matraz de tres bocas, de fondo redondo y 250 mL se añadió dietilenglicol (1.83 mL, 32.8 mmol) disuelto en 150 mL de diclorometano. A continuación, se agregó ácido lipoico (1 g, 4.8 mmol), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (1.03 g, 5.4 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (cantidad catalítica) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. Tras este tiempo, se añadió agua desionizada y se extrajo la fase orgánica con más diclorometano. Se lavó con carbonato sódico acuoso (10%) y posteriormente con salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato magnésico anhidro, se filtró y se concentró dando lugar a **L-DEG** como un líquido amarillo con un rendimiento del 90%.

$^1\text{H RMN}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 4.22 (m, 2H), 3.65-3.72 (m, 4H), 3.49-3.59 (m, 3H), 3.03-3.19 (m, 2H), 2.38-2.48 (m, 1H), 2.32 (t,  $J=7.4$  Hz, 2H), 1.82-1.93 (m, 1H), 1.59-1.71 (m, 4H), 1.38-1.50 (m, 2H).

### Síntesis de L-OH

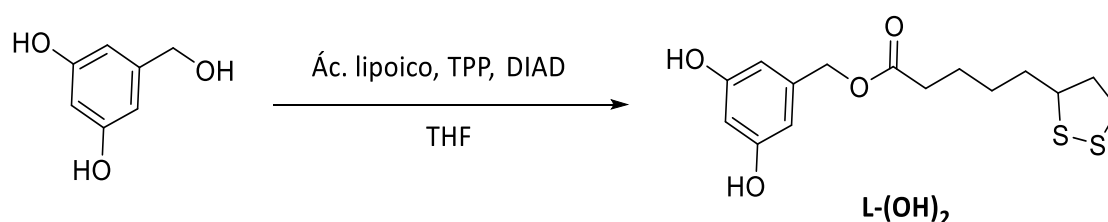


En un matraz de tres bocas, de fondo redondo y 100 mL se añadió 4-(2-hidroxiethyl)fenol (1 g, 7.2 mmol) disuelto en 45 mL de THF seco. A continuación, se agregó TPP (1.90 g, 7.2 mmol) y DIAD (1.42 mL, 7.2 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos bajo atmosfera de argón. Seguidamente, se

incorporó ácido lipoico (1.50 g, 7.2 mmol) en 5 mL de THF seco y la reacción se mantuvo bajo agitación durante 48 horas a temperatura ambiente. Tras este tiempo, se evaporó el disolvente y el crudo de reacción resultante se purificó mediante columna cromatográfica de sílica gel (eluyente: hexano/acetato de etilo 1:1), obteniendo el **L-OH** como un sólido amarillento con un rendimiento del 23 % (0.54 g).

$^1\text{H RMN}$  (300MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$  (ppm) = 7.07 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 6.73 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 4.19 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 3.53-3.60 (m, 1H), 3.07-3.21 (m, 2H), 2.81 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 2.39-2.47 (m, 1H), 2.26 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 1.83-1.92 (m, 1H), 1.52-1.72 (m, 4H), 1.34-1.41 (m, 2H).

#### Síntesis de **L-(OH)<sub>2</sub>**



En un matraz de dos bocas, de fondo redondo y 50 mL se añadió alcohol 3,5-dihidroxibencílico (200 mg, 1.40 mmol) disuelto en 20 mL de THF seco. A continuación, se agregó TPP (374 mg, 1.40 mmol) y DIAD (280  $\mu\text{L}$ , 1.40 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos bajo atmosfera de argón. Seguidamente, se añadió ácido lipoico (294 mg, 1.40 mmol) en 5 mL de THF seco y la reacción se mantuvo bajo agitación durante 12 horas a temperatura ambiente. Tras este tiempo, se evaporó el disolvente de la reacción y el crudo resultante se purificó mediante columna cromatográfica de sílica gel (eluyente: hexano/acetato de etilo 1:1), obteniéndose **L-(OH)<sub>2</sub>** como un sólido ocre con un rendimiento del 14 %.

$^1\text{H RMN}$  (300MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) = 6.28 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 2H), 6.21 (t,  $J$  = 2.2 Hz, 1H), 4.96 (s, 2H), 3.52 (m, 1H), 3.03-3.22 (m, 2H), 2.38-2.51 (m, 3H), 1.80-1.94 (m, 1H), 1.59-1.75 (m, 4H), 1.41-1.53 (m, 2H).

**$^{13}\text{C}$  RMN** (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) = 25.8, 29.7, 34.9, 35.7, 39.3, 41.2, 57.4, 67.1, 103.2, 107.4, 139.8, 159.7, 175.1.

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3350 (-OH), 2950 (Ar-H), 1710 (C=O) y 1260 (C-O).

### **Síntesis nanopartículas de oro estabilizadas con citrato (AuNPs)**

Todas las reacciones se llevaron a cabo con material de vidrio previamente limpiado con agua regia. En un matraz de fondo redondo de 250 mL, se añadió una disolución acuosa de  $\text{HAuCl}_4$  (100 mL, 1 mM) y se calentó a reflujo ( $120^\circ\text{C}$ ). Al empezar la ebullición, se añadió una disolución acuosa de citrato de sodio (10 mL, 38.8 mM) y la disolución resultante se calentó a reflujo con fuerte agitación durante 30 minutos momento en el que el color de la disolución se volvió rojo, indicando la formación de las nanopartículas de oro estabilizadas con citrato. Finalmente, la disolución se dejó enfriar a temperatura ambiente.

### **Preparación de los distintos dosímetros (AuNP-PMD, AuNP-NH<sub>2</sub>, AuNP-NHMe, AuNP-B(OH)<sub>2</sub>, AuNP-(OH)<sub>2</sub>)**

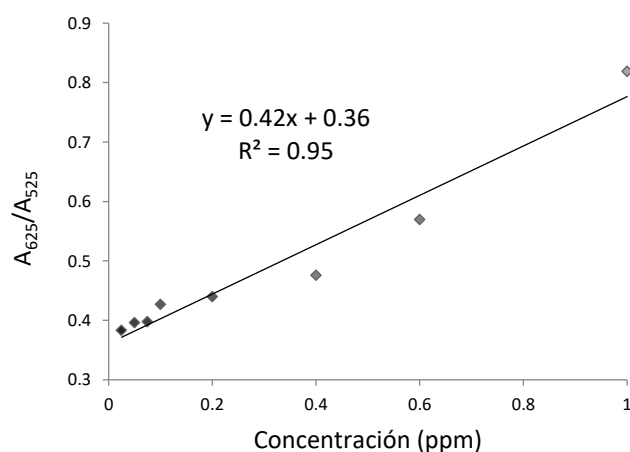
Se tomaron 5 mL de la disolución anterior de nanopartículas de oro estabilizadas con citrato y se añadieron 45  $\mu\text{L}$  de una disolución acuosa de hidróxido sódico 0.5 M. A continuación, se agregaron simultáneamente las disoluciones del ligando correspondiente (**L-PMD**, **L-OH**, **L-B(OH)<sub>2</sub>** o **L-(OH)<sub>2</sub>**, 50  $\mu\text{L}$ , 0.01 M en metanol en cada caso) y el estabilizante correspondiente (**L-TA** o **L-DEG**, 150  $\mu\text{L}$ , 0.01 M en metanol) y la mezcla se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente durante 12 horas. Finalmente, la suspensión se centrifugó a 10500 revoluciones por minuto durante 18 minutos y tras decantar el sobrenadante, se resuspendió en el medio acuoso correspondiente, almacenándola hasta su uso.

### Estudio de la respuesta de AuNP-(OH)<sub>2</sub> frente a formaldehído a distintos valores de pH

Se prepararon mezclas de **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** (100 µL) y formaldehído (100 µL, 20 mM) tanto en agua miliQ como en distintos tampones (fosfato, tris-HCl o carbonato, 10 mM) y valores de pH (5.7, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 y 10.0). Todas las disoluciones fueron agitadas a temperatura ambiente durante 15 minutos. Seguidamente, se registraron los correspondientes espectros de UV-visible (gráfica 21) y se representó el ratio de absorbancia a 645 y 525 nm ( $A_{645}/A_{525}$ ). Todas las medidas fueron realizadas por duplicado.

### Determinación del límite de detección de AuNP-(OH)<sub>2</sub> para formaldehído en disolución

Para llevar a cabo los experimentos de determinación del límite de detección, se añadieron 100 µL de formaldehído acuoso (a partir de formalina comercial 35 % o disoluciones diluidas de la misma, cuyo contenido real en formaldehído fue determinado utilizando el método del sulfito de sodio<sup>156</sup>) a 100 µL de **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** (10<sup>-9</sup>M, en disolución tamponada tris-HCl 10 mM, pH 7), alcanzando una concentración final de formaldehído entre 25 y 1000 µM. A continuación, la mezcla se sometió a una ligera calefacción (38°C) durante 15 minutos, tras los cuales, se añadieron 200 µL de agua miliQ para facilitar la medida y se registró el espectro de UV-visible. Por último, se representó la relación entre la absorbancia a 645 nm y la absorbancia a 525 nm ( $A_{645}/A_{525}$ ) frente a la concentración de formaldehído (gráfica 25).



**Gráfica 25.** Representación de la relación entre la absorción a 645 nm y la absorción a 525 nm frente a la concentración de formaldehído y ajuste lineal de la recta obtenida.

El cálculo del límite de detección se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Límite de detección} = 3 \cdot \frac{S_b}{m}$$

Donde  $S_b$  es la desviación estándar del blanco (0.00235) y  $m$  es la pendiente de la recta de calibrado (0.42).

### Estudio de interferentes

Para el estudio de interferentes, se expuso **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** a distintos aldehídos y cetonas que podrían considerarse interferentes (acetaldehído, glioxal, acetona, glucosa, butanal, benzaldehído, formaldehído y una mezcla de todos ellos). En cada caso, 100  $\mu$ L del interferente (100 mM en agua) se añadieron a 100  $\mu$ L de la suspensión acuosa de **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** (tampón tris-HCl, 10 mM, pH 7) y la mezcla se agitó durante 15 minutos. A continuación, se añadieron 200  $\mu$ L de agua miliQ para facilitar el registro del espectro de UV-visible.



### Estudios de detección de formaldehído en fase gas a partir de formalina

Para llevar a cabo estos experimentos, se situaron 400  $\mu\text{L}$  de **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** en un vial, el cual se introdujo dentro de un recipiente cerrado conteniendo formaldehído gas generado a partir del equilibrio liquido-vapor de una disolución diluida de formalina (5 mL) que rodeaba dicho vial a 25 °C. Para llevar a cabo la determinación de la concentración de formaldehído gas existente, utilizamos la ley de Henry y las fórmulas mostradas a continuación (fórmula 1), donde se consideró una  $H_{\text{eff}}^{115} = 3700 \text{ M atm}^{-1}$ .

$$P(\text{atm}) = \frac{\text{Concentración (M)}}{H_{\text{eff}}(\text{M} \cdot \text{atm}^{-1})}$$

$$\text{ppm} = P(\text{atm}) \cdot 10^6$$

**Fórmula 1.** Fórmulas para el cálculo de la concentración de formaldehído gas a partir de la concentración de formalina.

### Estudios de detección de formaldehído en fase gas a partir de tableros comerciales

Al igual que en el caso anterior, para llevar a cabo estos experimentos se situó una suspensión de **AuNP-(OH)<sub>2</sub>** (300  $\mu\text{L}$ ,  $9.72 \times 10^{-10} \text{ M}$  en tampón tris-HCl, 10 mM, pH 7) en un vial, el cual se introdujo dentro de un recipiente cerrado que contenía los tableros comerciales (proporcionados en forma de cubos de 2.5 cm de lado con un peso aproximado de 15 g cada uno). Tras 15 horas (tiempo estimado para una emisión adecuada de formaldehído por parte de los tableros) se registraron los espectros de UV-visible y se representó la relación de absorbancias a 645 y 525 nm ( $A_{645}/A_{525}$ ). Todas las medidas se realizaron por duplicado.

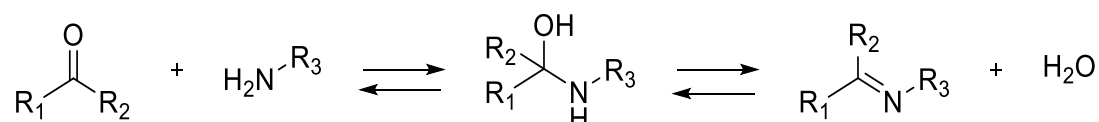


## **Capítulo 6: Detección fluorogénica y cromogénica de formaldehído empleando BODIPYs funcionalizados con un derivado de amina o hidracina en posición meso.**



## 6.1 Introducción

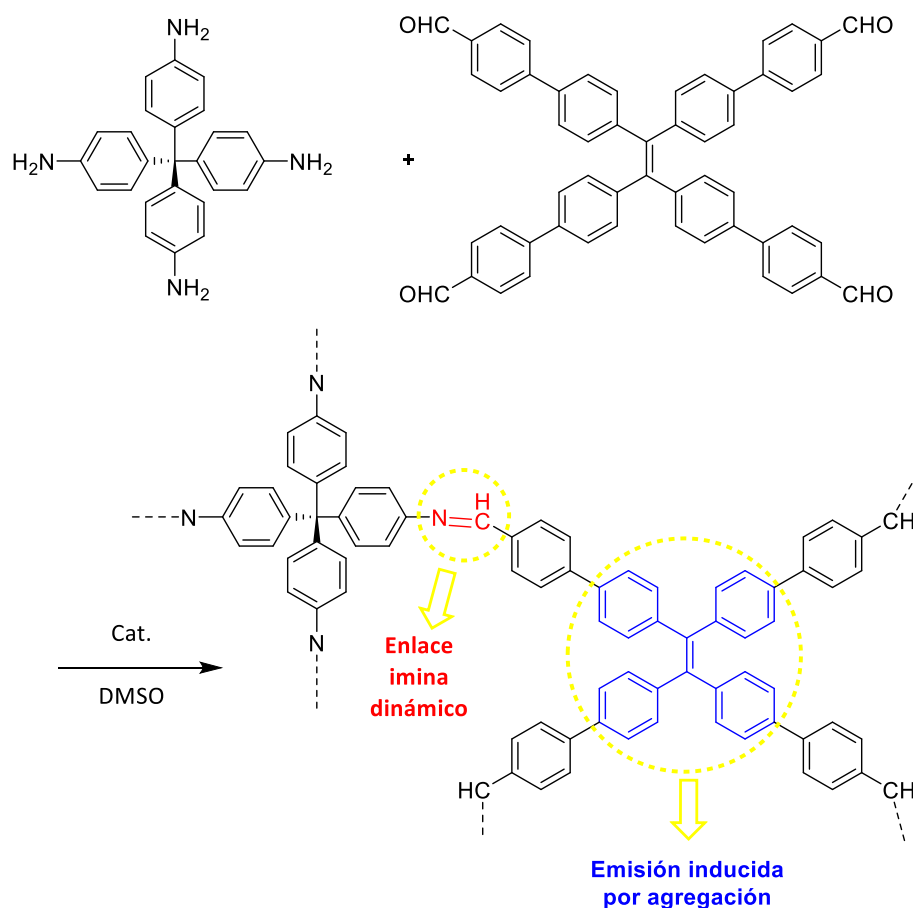
Tal y como se describió en la introducción de la presente memoria, el carbono del formaldehído es altamente electrofílico, lo que lo hace susceptible al ataque por nucleófilos. Los compuestos nitrogenados del tipo amina, hidrazina o hidroxilamina constituyen una de las familias de compuestos nucleofílicos más importante en química orgánica. En este sentido, una de las reacciones más comunes de aldehídos y cetonas es la condensación con aminas primarias para dar lugar a iminas. Esta reacción transcurre en dos etapas (esquema 37), una primera etapa reversible en la que se da el ataque nucleofílico para formar un hemiaminal y una segunda etapa donde se produce la pérdida de una molécula de agua.



**Esquema 37.** Esquema de reacción de formación de iminas mediante condensación de aldehídos o cetonas con aminas.

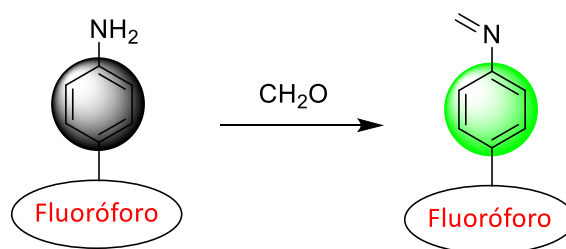
El uso de esta reacción no se restringe únicamente al campo de la síntesis orgánica, sino que se extiende a diversos campos como la química de polímeros<sup>157</sup>, la química supramolecular<sup>158</sup> o más recientemente la química covalente dinámica<sup>159</sup> que se caracteriza por el uso de reacciones químicas reversibles (como la formación de un enlace imina entre aldehídos y aminas), para sintetizar moléculas orgánicas complejas bajo un equilibrio termodinámico, a partir de precursores orgánicos sencillos y asequibles. Podemos encontrar en la bibliografía ejemplos del uso de esta reacción de formación de iminas en el diseño de sensores moleculares, como el descrito por J. Zhang *et al.*<sup>160</sup> en 2014. Estos autores llevaron a cabo la preparación de un gel haciendo uso de la química dinámica covalente y la reversibilidad de la reacción de

formación de iminas, creando una estructura jerárquica altamente porosa capaz de detectar ciertos analitos como el ácido pícrico (figura 36).



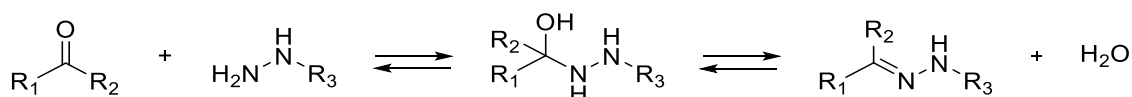
**Figura 36.** Diseño del sensor llevado a cabo por J. Zhang et al. basado en la formación dinámica de un gel mediante un enlace imina para su aplicación en detección de analitos. Imagen extraída del trabajo publicado en “*Chem. Commun.* **2014**, 50, 11942-11945” con el permiso de la editorial.

Un ejemplo del uso de esta reacción en un proceso de detección lo encontramos en el sensor diseñado por T. Thangadurai, S. Yoon *et al.*<sup>161</sup> en 2012 para la detección de formaldehído (figura 37). En dicho trabajo emplean la formación de una imina a partir de un residuo de anilina y formaldehído para la detección de éste. El cambio en las propiedades electrónicas asociadas a la transformación del grupo amina en imina produce la disminución o desaparición del efecto PET inicial que causaba la desactivación de la fluorescencia del sensor, originando un aumento de la fluorescencia.



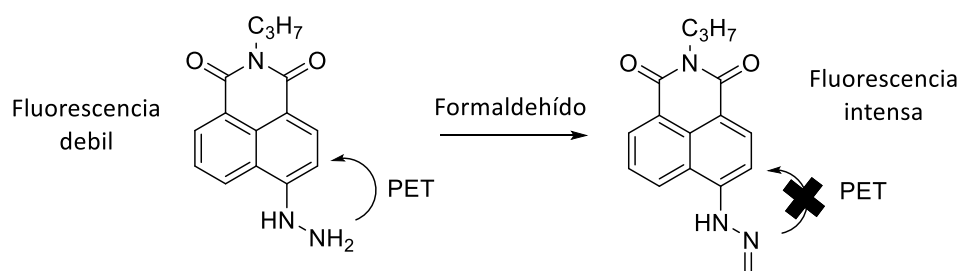
**Figura 37.** Representación del sensor preparado por T. Thangadurai, S. Yoon et al. para la detección de formaldehído mediante la formación de una imina. Imagen extraída del trabajo publicado en “*Tetrahedron Lett.* **2012**, 53, 4913-4916” con permiso de la editorial.

Una reacción similar a la descrita anteriormente es la condensación entre aldehídos o cetonas con hidrazinas para dar lugar a hidrazonas. El mecanismo de esta reacción, de manera análoga al de la formación de iminas, transcurre en dos etapas (esquema 38).



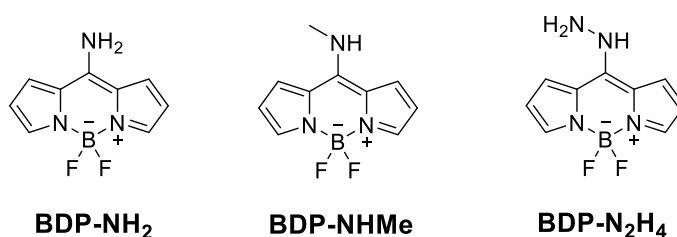
**Esquema 38.** Esquema de reacción de formación de hidrazonas mediante condensación de aldehídos o cetonas con hidrazinas.

Podemos encontrar el uso de esta reacción en la síntesis de ciertos fármacos antibacterianos<sup>162</sup>, sistemas de liberación controlada<sup>163</sup> o en la fabricación de soportes poliméricos<sup>164</sup>. Por lo que respecta al campo de los sensores, la formación de hidrazonas ha sido empleada para la detección de distintos compuestos carbonílicos como acetaldehído<sup>165</sup> o formaldehído<sup>166</sup>. Así, por ejemplo, W. Lin *et al.* desarrollaron un dosímetro basado en una 1,8-naftalimida funcionalizada con un grupo hidrazina capaz de llevar a cabo la detección de formaldehído en tejidos vivos (esquema 39). El cambio de hidrazina a hidrazona genera un aumento de la fluorescencia del sistema debido a la supresión del efecto PET inicialmente observado.



**Esquema 39.** Diseño del sensor llevado a cabo por W. Lin et al. para la detección de formaldehído basado en la formación de una hidrazona a partir de una hidrazina y formaldehído. Imagen extraída del trabajo publicado en “*Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 1-5” con permiso de la editorial.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se pensó que sería interesante evaluar la capacidad sensora frente a formadehído de distintos derivados de BODIPY conteniendo grupos nitrogenados (aminas o hidracina, figura 38). La elección del núcleo de BODIPY como unidad señalizadora se fundamentó en sus particulares propiedades ópticas que pueden ser fácilmente moduladas mediante las apropiadas variaciones estructurales, tal y como se ha descrito anteriormente. Por lo que respecta a la posición de los grupos nitrogenados en el núcleo del BODIPY, se decidió utilizar la posición 8 (*meso*) con el objetivo de maximizar el cambio en las propiedades ópticas del sistema tras la reacción con el formaldehído<sup>167</sup>.

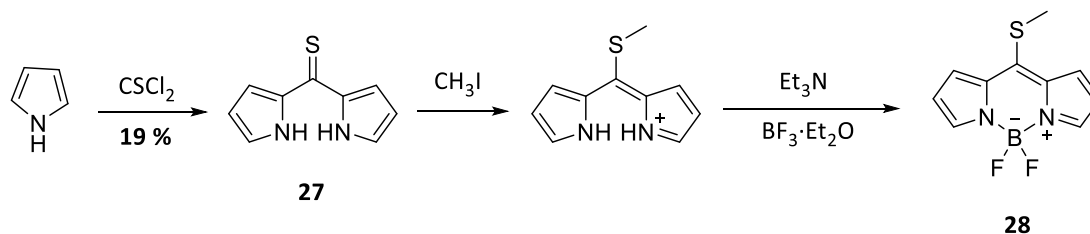


**Figura 38.** Estructura de los dosímetros diseñados para la detección de formaldehído.



## 6.2 Resultados y discusión

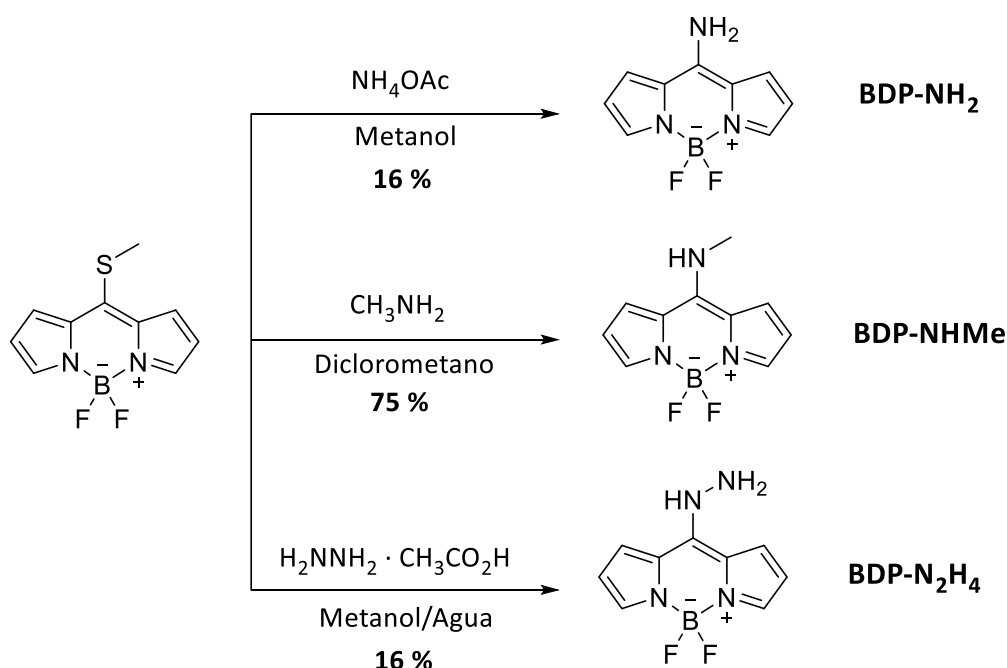
Debido a la naturaleza nucleofílica de los sustituyentes que se pretendía introducir en la posición 8 del núcleo de BODIPY, se decidió emplear 8-tiometil-BODIPY (**28**) como sustrato común en todas las metodologías sintéticas ya que estaba descrito que el grupo tiometilo era fácilmente sustituido por nucleófilos<sup>168</sup>. Para llevar a cabo la síntesis de **28**, se utilizó la metodología descrita por J.F. Biellmann<sup>31</sup>, que podemos resumir en el siguiente esquema (esquema 40).



**Esquema 40.** Metodología sintética para la obtención del 8-tiometilbodipy (**28**).

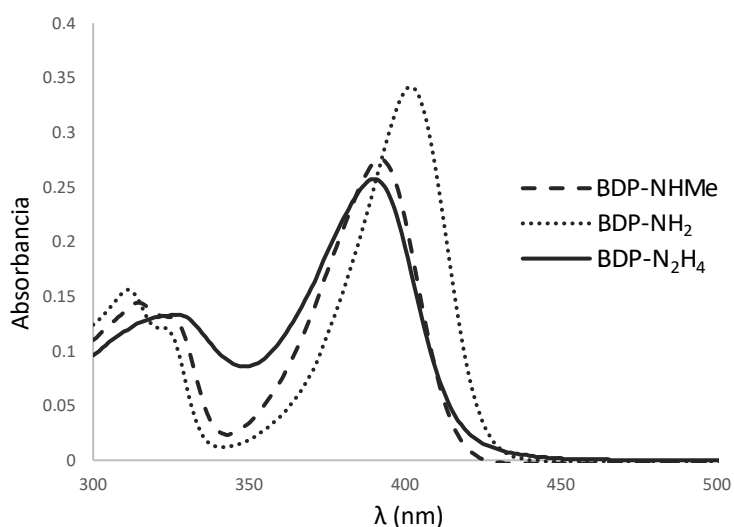
Como se puede observar en la figura anterior, la reacción de dos equivalentes de pirrol con tiofosgeno dio lugar a la tiocetona **27**. El ataque nucleofílico del azufre de la tiocetona al yoduro de metilo permitió la obtención del correspondiente tiometildipirrometeno. Por último, la reacción de éste con trifluoruro de boro dietileterato en presencia de trietilamina dio lugar al tiometil BODIPY **28**.

Una vez obtenido el precursor deseado, se procedió a hacerlo reaccionar con los nucleófilos aminados correspondientes para obtener los potenciales sensores. Las condiciones empleadas para la obtención de **BDP-NH<sub>2</sub>** fueron acetato amónico en metanol/agua a 70°C durante 20 horas, metilamina en diclorometano a temperatura ambiente (20°C aproximadamente) durante 26 horas para **BDP-NHMe** y acetato de hidrazina en metanol a 70°C durante 5 horas para **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** (esquema 41).



**Esquema 41.** Síntesis de los distintos dosímetros a partir del 8-tiometilbodipy.

Los rendimientos obtenidos para **BDP-NH<sub>2</sub>** y **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** son cercanos al 20%, mientras que para **BDP-NHMe** fue del 75%. Los espectros de absorción de los compuestos preparados presentaron máximos de absorción a 402 ( $\epsilon = 3.41 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), 392 ( $\epsilon = 2.70 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) y 390 ( $\epsilon = 2.57 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) nm para **BDP-NH<sub>2</sub>**, **BDP-NHMe** y **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** respectivamente (gráfica 26).



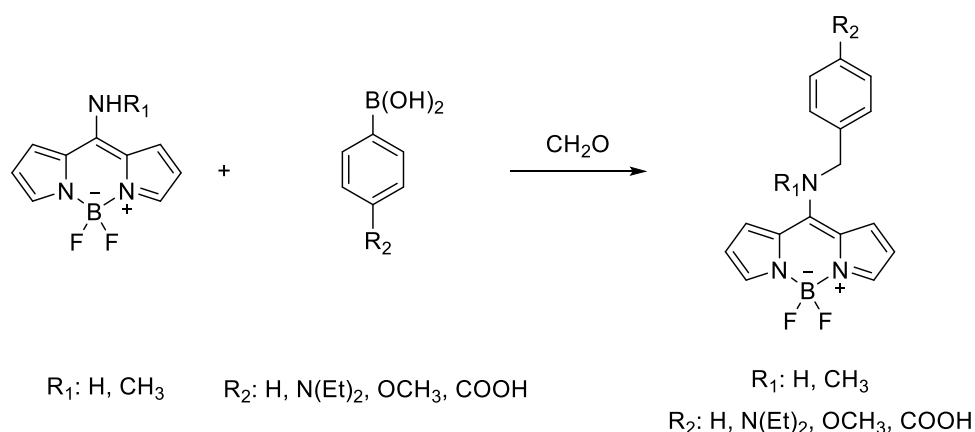
**Gráfica 26.** Espectros de absorción de los dosímetros sintetizados (acetonitrilo,  $10^{-5} \text{ M}$ ).

Una vez registrados los espectros iniciales, se procedió a evaluar la modificación de las propiedades ópticas de cada uno de los dosímetros en presencia de formaldehído. En primer lugar, se estudiaron los compuestos aminados **BDP-NH<sub>2</sub>** y **BDP-NHMe**. Tras exponer disoluciones de ambos compuestos (acetonitrilo, 10<sup>-5</sup> M) a un exceso de formaldehído acuoso (36%) bajo diferentes condiciones de concentración y temperatura, no se observó ninguna variación en sus propiedades espectroscópicas.

Tras analizar los experimentos realizados, se pensó que existían al menos dos factores capaces de justificar los resultados obtenidos. El primero podría ser que el equilibrio de esta reacción reversible no esté muy desplazado hacia la formación de iminas impidiendo la acumulación de suficiente cantidad de producto de reacción como para generar un cambio observable en las propiedades ópticas del sistema. El segundo sería la unión de los grupos amino a un centro electrón-atractor como el núcleo de BODIPY<sup>169</sup>, lo que podría reducir en gran medida el carácter nucleófilo de dichos grupos y por lo tanto su reactividad.

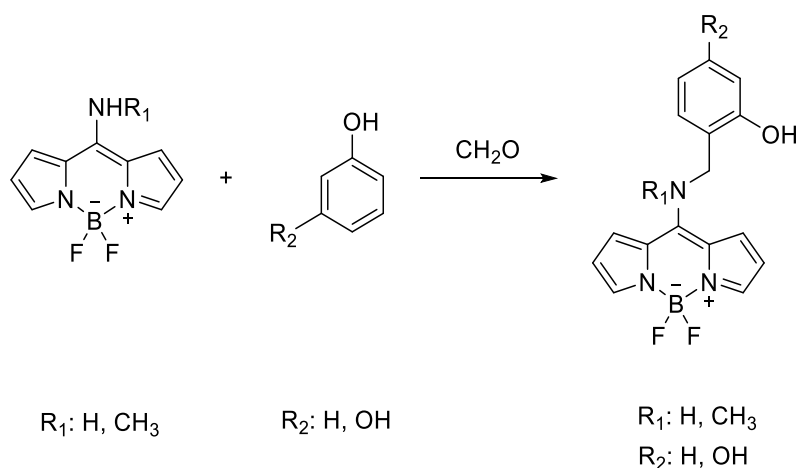
Para estudiar este problema y comprobar qué factor influía en la falta de respuesta del dosímetro, se llevaron a cabo una serie de experimentos haciendo reaccionar ambos dosímetros con formaldehído en presencia de distintas moléculas capaces de “captar” irreversiblemente la imina formada transformándola en una amina y desplazando el equilibrio global hacia la derecha.

La primera estrategia empleada fue el uso de derivados del ácido fenilborónico<sup>170</sup> (empleando grupos dadores y atractores de electrones como sustituyentes) para tratar de llevar a cabo una reacción de Petasis con la imina generada (figura 39).



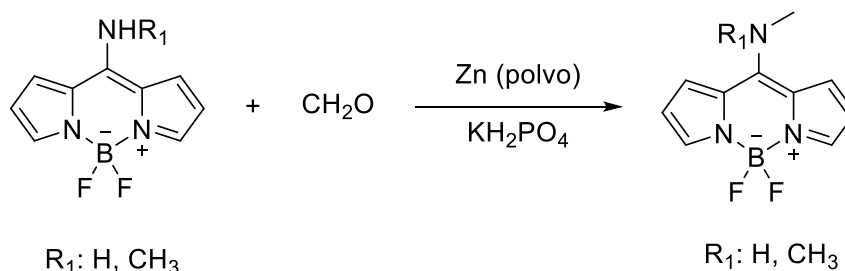
**Figura 39.** Estrategia empleada para la detección de formaldehído haciendo uso de la reacción de Petasis.

La segunda estrategia utilizada fue la reacción con formaldehído en presencia de fenol o resorcinol para dar lugar a la correspondiente amina a través de una reacción de Betti<sup>142</sup> (esquema 42).



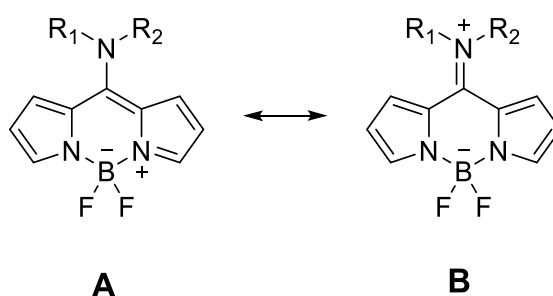
**Esquema 42.** Estrategia empleada para la detección de formaldehído haciendo uso de la reacción de Mannich.

La última estrategia consistió en intentar llevar a cabo la detección de formadehído en presencia de una mezcla de zinc e hidrogenofosfato potásico con el objetivo de hidrogenar *in situ* la imina generada en el medio de reacción (Esquema 43).



**Esquema 43.** Estrategia empleada para la detección de formaldehído mediante la hidrogenación de la imina formada.

Sin embargo, tras registrar los espectros de UV-vis de cada uno de los ensayos realizados, no se observaron cambios apreciables en la posición o intensidad de la banda de absorción de los dosímetros de partida. A la vista de los resultados obtenidos, se descartó el argumento de la reversibilidad en la formación de iminas como motivo de la baja respuesta de los dosímetros **BDP-NH<sub>2</sub>** y **BDP-NHMe** frente a formaldehído. En cambio, concluimos que grupos electrón-dadores como una amina primaria o secundaria en posición *meso* al cuerpo del BODIPY poseen un carácter nucleófilo muy limitado. Esta disminución de la nucleofilia es debida a la deslocalización del sistema  $\pi$  del núcleo del BODIPY que otorga a la forma resonante hemicianina (**B**, esquema 44) una gran contribución a la estructura global de la molécula<sup>32,171</sup>. Por tanto, este hecho podría estar impidiendo la reacción de dichos grupos con formaldehído, imposibilitando así el uso de estos compuestos como dosímetros para la detección de dicho analito.



**Esquema 44.** Formas resonantes de BDP-NH<sub>2</sub> y BDP-NHMe.

Tras la escasa o nula respuesta observada frente al formaldehído al emplear BODIPY funcionalizados con aminas primarias o secundarias en la posición *meso*, se pasó a explorar la posibilidad de emplear el derivado de hidracina **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** como dosímetro frente a formaldehído. En este caso, al no estar el nitrógeno nucleofílico comprometido en la deslocalización electrónica con el BODIPY, era de esperar que no aparecieran los problemas anteriormente comentados. Como se ha mencionado anteriormente, el espectro de UV-vis de **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** (acetonitrilo, 10<sup>-5</sup> M) presentó una banda de absorción principal a 390 nm y una secundaria a 327 nm. El espectro de fluorescencia en acetonitrilo mostró una banda muy débil a 455 nm ( $\lambda_{\text{exc}} = 425$  nm) con un rendimiento cuántico prácticamente nulo.

Es conocido que la naturaleza del disolvente en ciertos BODIPYs sustituidos en la posición *meso*, puede modificar sus propiedades espectroscópicas<sup>172</sup>. Por tanto, con el objetivo de estudiar los posibles efectos solvatocrómicos de **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>**, llevamos a cabo el estudio de la variación de la longitud de onda máxima de absorción en presencia de disolventes próticos o apróticos de distinta polaridad (tabla 4).

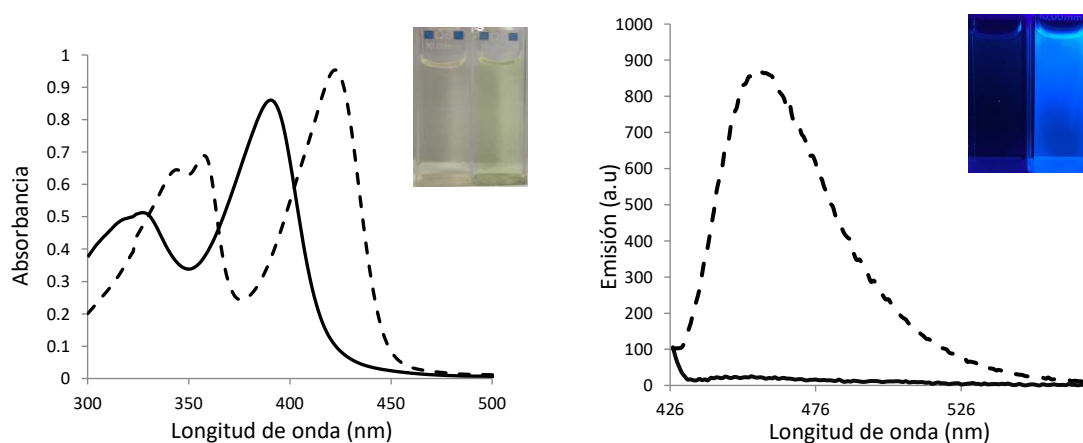
Disolvente	<b>BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub></b>
	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)
Agua	385
Metanol	386
Acetonitrilo	390
Cloroformo	409
Tolueno	414

**Tabla 4.** Longitudes de onda de las bandas de absorción de BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> en distintos disolventes.

Los resultados obtenidos con este compuesto (tabla 4) muestran un desplazamiento hipsocrómico del máximo de absorción con el aumento de la polaridad del disolvente, en concordancia con lo descrito en la bibliografía para otros 8-aminoBODIPY derivados<sup>171</sup>. Este efecto se relaciona con las interacciones específicas

(como los puentes de hidrógeno) entre el par de electrones solitarios del grupo amino y el disolvente. De todos modos, los cambios de la banda de absorción no fueron demasiado marcados por lo que se decidió seguir trabajando con acetonitrilo.

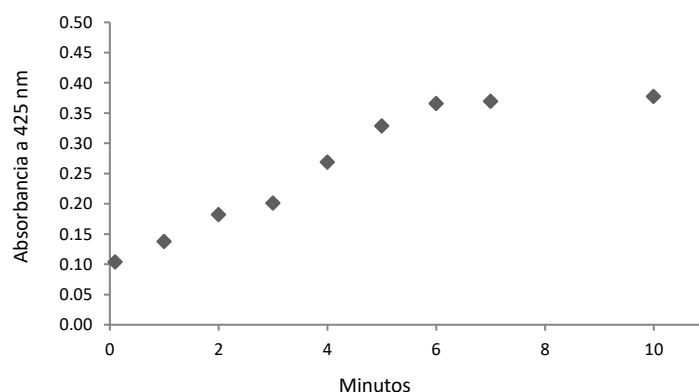
Los primeros experimentos de detección se llevaron a cabo empleando una disolución de **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** (acetonitrilo,  $10^{-5}$  M) a temperatura ambiente y formaldehído acuoso (20 mM) como fuente de formaldehído. Tras unos minutos, se observó que ambas bandas sufren un desplazamiento batocrómico en presencia de formaldehído. La banda de 327 nm se desplaza a 350 nm mientras que la de 390 nm se desplaza a 425 nm, junto con un cambio de color en la disolución de incoloro a amarillo pálido. Este cambio en la región de UV fue atribuido a la formación de la correspondiente hidrazona resultante de la reacción entre **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** y formaldehído. Por otra parte, la adición de formalina a la disolución de **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** produjo también un gran aumento en la emisión de fluorescencia a 455 nm al irradiar la disolución a una  $\lambda_{\text{exc}} = 425$  nm (gráfica 27), cambio que era visible a simple vista usando una lámpara de ultravioleta manual.



**Gráfica 27.** Espectro de UV-visible (izquierda) y fluorescencia (derecha,  $\lambda_{\text{exc}} = 425$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 455$ ) de **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** (acetonitrilo,  $10^{-5}$  M) en ausencia (línea continua) y presencia de formalina (20 mM, línea discontinua). Inserción izquierda: cambios de color tras la adición de formalina (20 mM). Inserción derecha: cambios visuales observados tras la adición de formalina (20 mM) bajo una lámpara manual de luz ultravioleta (365 nm).

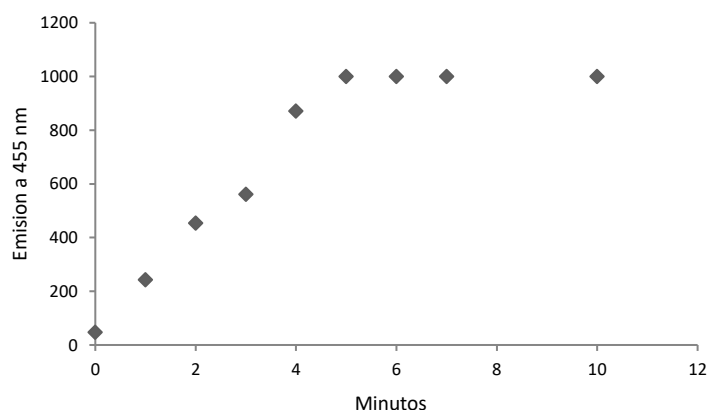
Para confirmar que los cambios espectrales observados eran debidos a la formación de la hidrazona, esta se preparó independientemente haciendo reaccionar **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** y formalina (20 mM) en acetonitrilo a temperatura ambiente, identificando el producto obtenido por resonancia magnética nuclear de protón. El espectro de UV-visible y fluorescencia del compuesto sintetizado coincidían con los obtenidos previamente en los experimentos de detección, siendo el rendimiento cuántico de la hidrazona, determinado utilizando sulfato de quinina como referencia, de 0.16.

Con el fin de optimizar las condiciones de medida, se llevó a cabo un estudio de la relación “tiempo de reacción/respuesta del dosímetro”. Para ello, se hizo reaccionar **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** con exceso de formalina y se registró el espectro de absorbancia y fluorescencia de la mezcla a intervalos de un minuto (gráfica 28 y 29). El resultado de este experimento mostró que tras 7 minutos de reacción se alcanzaba el máximo en la absorbancia ( $\lambda_{\text{abs}} = 425 \text{ nm}$ ) y tras 5 minutos el valor máximo en fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 425 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 455$ ), manteniéndose inalterado durante los minutos posteriores. Por ello, se empleó el valor más elevado (7 minutos) en los estudios de detección posteriores.



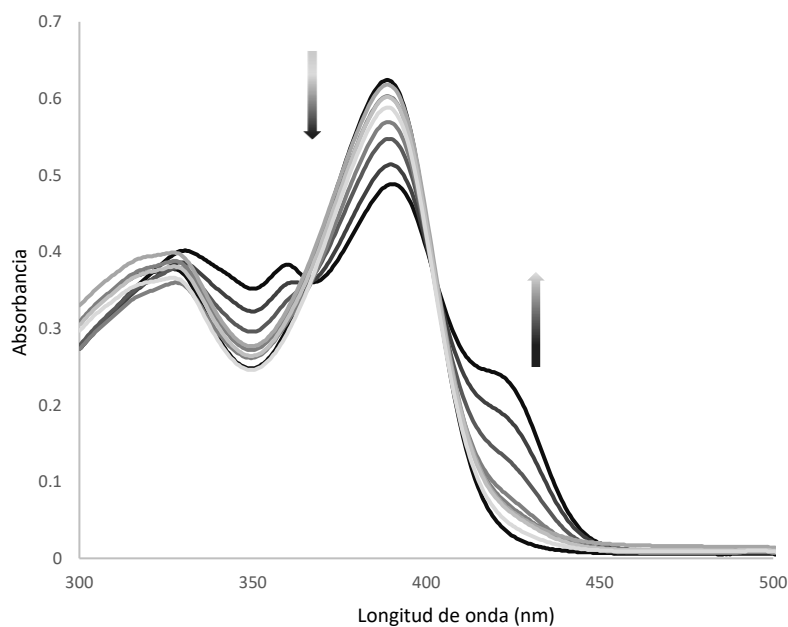
**Gráfica 28.** Absorbancia de BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (10<sup>-5</sup> M, acetonitrilo) a 425 nm cada minuto tras la exposición a formalina (20 mM).



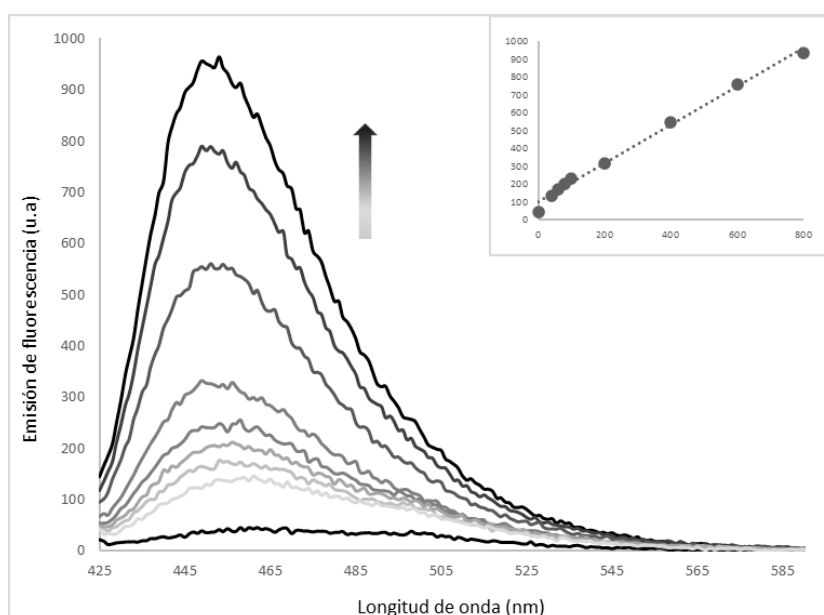


**Gráfica 29.** Emisión de fluorescencia de BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> a 455 nm cada minuto tras la exposición a formalina (20 mM).

Una vez terminada la caracterización del dosímetro y establecidas las condiciones de medida, se pasó a evaluar la sensibilidad del sistema. Para ello, se hizo reaccionar el dosímetro con concentraciones crecientes de formaldehído acuoso (desde 40 a 800  $\mu$ M) a temperatura ambiente y tras el tiempo establecido se registraron los espectros de UV-visible y fluorescencia (gráfica 30 y 31).



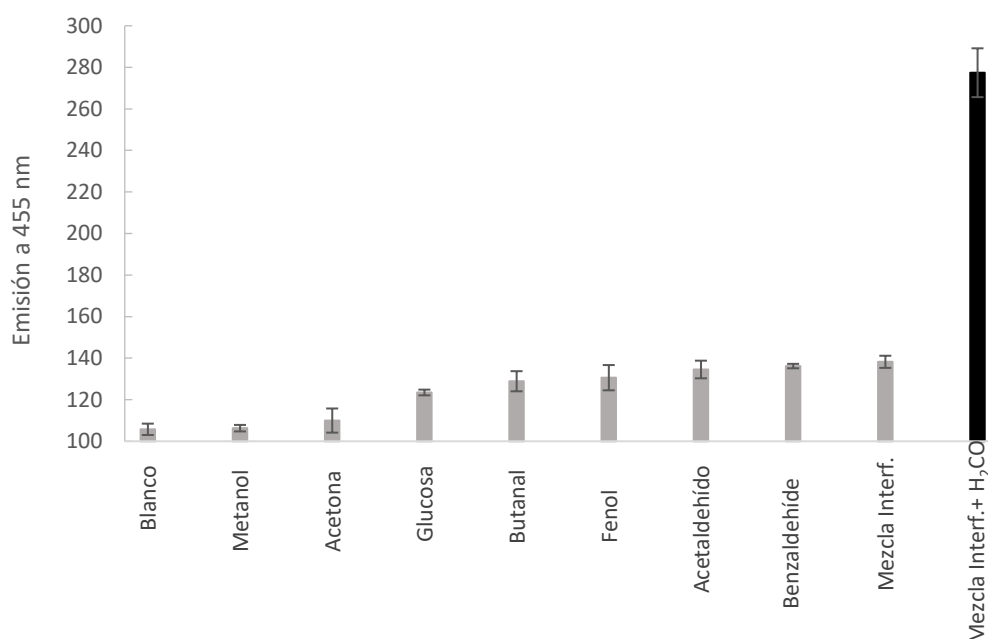
**Gráfica 30.** Espectro de UV-visible de BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (acetonitrilo, 10<sup>-5</sup> M) en presencia de concentraciones crecientes de formalina (desde 40 a 800  $\mu$ M).



**Gráfica 31.** Espectro de emisión de BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (acetonitrilo, 10<sup>-5</sup> M,  $\lambda_{exc}$  = 425 nm) en presencia de concentraciones crecientes de formalina (desde 40 a 800  $\mu$ M). Inserción: Representación del máximo de emisión de fluorescencia frente a la concentración de formalina.

Basado en los datos obtenidos en los experimentos de fluorescencia, el límite de detección (LdD) se determinó empleando la siguiente ecuación:  $LdD = 3 S_{b1}/S$ , donde  $S_{b1}$  es la desviación estándar del blanco (1.80) y  $S$  es la pendiente de la recta obtenida de la gráfica donde se representa el máximo de emisión de fluorescencia frente a la concentración de formalina (1.30)). Empleando este método, se obtuvo un límite de detección de 4  $\mu$ M (0.12 ppm).

Para finalizar la evaluación de la eficacia del dosímetro preparado, se estudió su selectividad frente a otros compuestos similares. Para llevar a cabo estos experimentos, se hizo reaccionar **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** (acetonitrilo, 10<sup>-5</sup> M) con distintos compuestos carbonílicos y especies potencialmente interferentes (50  $\mu$ M de metanol, acetona, glucosa, fenol, butanal, acetaldehído y benzaldehído en cada caso) bajo condiciones iguales a las empleadas para los experimentos anteriormente descritos. Además, se empleó una mezcla de todos los interferentes utilizados en presencia y ausencia de formaldehído con el objetivo de evaluar la capacidad de respuesta del sistema en presencia de posibles interferentes (gráfica 32).



**Gráfica 32.** Respuesta de BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> frente a diversas especies potencialmente interferentes en la detección de formaldehído (50  $\mu$ M de cada interferente).

Los resultados obtenidos mostraron que en general, no existía una respuesta fluorescente importante en presencia de los interferentes utilizados, indicando que no había tenido lugar la reacción de formación de la hidrazona correspondiente. Sin embargo, sí se observó respuesta por parte de **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** tras la adición de formaldehído a la mezcla de interferentes, confirmando la capacidad del dosímetro para discriminar al analito objeto de estudio en presencia de una mezcla de interferentes que pueden encontrarse en ambientes reales.

Tras comprobar la selectividad de **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** y demostrar su efectividad como dosímetro para la detección de formaldehído en disolución, decidimos extender el estudio a la detección de formaldehído en fase gas. Para ello, se prepararon tiras reactivas de dosímetro sumergiendo papel de filtro en una disolución 10<sup>-1</sup> M de **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** en acetonitrilo y dejándolas, posteriormente, secar al aire durante 30 minutos, de modo que el dosímetro quedara soportado sobre el papel de filtro. De este modo se dispuso de un dispositivo útil para, de manera rápida y sencilla, realizar experimentos de detección de formaldehído gas. En estos experimentos, las tiras reactivas se

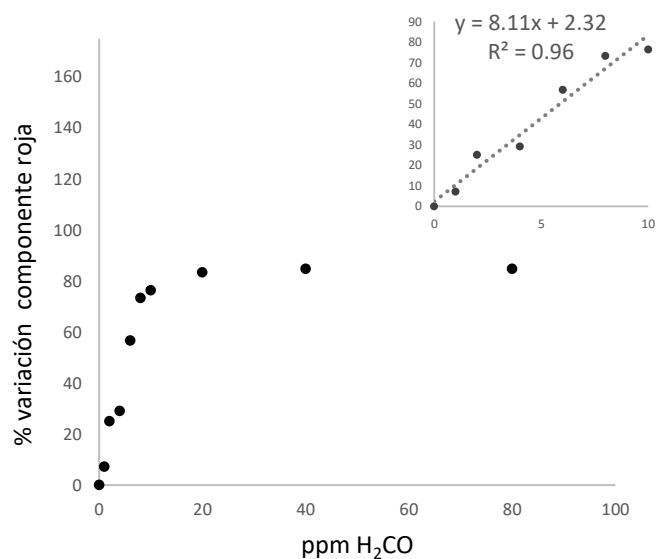
expusieron a un volumen determinado de aire en presencia de concentraciones crecientes de formaldehído y se evaluó la respuesta fluorimétrica de cada una de ellas bajo luz UV (figura 40).



**Figura 40.** Tiras reactivas con BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> soportado expuestas a concentraciones crecientes de formaldehído en fase gas durante 20 minutos (de izquierda a derecha, 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40 y 80 ppm) e iluminadas con una lámpara de UV (365 nm).

Para ello, las tiras reactivas se suspendieron en el interior de un vial (sistema cerrado) que contenía formaldehído gas en equilibrio con una disolución acuosa de formaldehído de concentración conocida a 25 °C, determinando la concentración del gas mediante la ley de Henry. Tras mantener el sistema durante 20 minutos y situarlo bajo una lámpara de ultravioleta (365 nm) se observó un gran aumento de la fluorescencia en las tiras reactivas, así como un ligero cambio de color desde un amarillo pálido a un amarillo intenso. Sin embargo, la tira reactiva con **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** soportado empleada como blanco (sin exposición a formaldehído) no mostró cambios ópticos apreciables. De este modo, se comprobó que se podía llevar a cabo una detección visual cualitativa de formaldehído en fase gas con el sensor soportado en fase sólida.

Con el objetivo de intentar cuantificar la respuesta del sistema, se tomaron fotografías de las tiras reactivas reveladas bajo la lámpara ultravioleta (365 nm) para llevar a cabo un tratamiento digital. A partir de estas fotografías, se obtuvieron las coordenadas RGB utilizando un programa de tratamiento de imagen (ImageJ). Así, se obtuvieron distintos valores de las coordenadas rojo, verde y azul para cada tira reactiva con respecto al blanco usado como control. Para llevar a cabo una estimación del límite de detección alcanzado, se representó el porcentaje de variación de la componente roja respecto al blanco frente a la concentración de formaldehído en fase gas (gráfica 33).



**Gráfica 33.** Representación del porcentaje de variación de la componente roja respecto al blanco frente a la concentración de formaldehído en fase gas (desde 1 a 80 ppm) tras 20 minutos de exposición.

A la vista del resultado obtenido, se puede afirmar que el porcentaje de variación de la componente roja respecto al blanco aumenta de manera lineal con la concentración de formaldehído gas hasta alcanzar un máximo alrededor de 20 ppm, concentración a la que se produce la saturación del dosímetro. Estos experimentos permitieron determinar un límite de detección de 1.1 ppm a partir de la recta de regresión, empleando la misma fórmula utilizada para los estudios en disolución.

## 6.3 Conclusiones

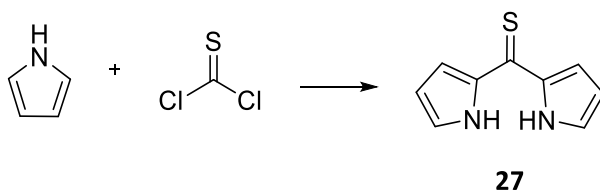
Como conclusión, se han sintetizado los derivados de BODIPY **BDP-NH<sub>2</sub>**, **BDP-NHMe** y **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** y se ha evaluado su potencial como sensores de formaldehído. De ellos, el sensor **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** ha demostrado ser efectivo para la detección de formaldehído tanto en disolución como en fase gas. El mecanismo de detección se basa en la formación de una hidrazona mediante la reacción entre el grupo hidrazina del sensor y formaldehído, produciendo un cambio en las propiedades ópticas de la molécula (en su espectro de absorción UV-vis y en el de emisión de fluorescencia). Los límites de detección alcanzados mediante fluorescencia son 0.12 ppm para formaldehído en disolución y 1.1 ppm para formaldehído en fase gas.

## 6.4 Parte experimental

### Métodos generales

Todos los reactivos utilizados están disponibles comercialmente y se han usado sin una purificación previa. Los disolventes empleados fueron destilados sobre Na y benzofenona (THF),  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) o secados sobre tamiz molecular previamente activado (el resto de los disolventes) antes de su uso. Para las cromatografías en capa fina se utilizó gel de sílice 60 F<sub>254</sub> (Merck) y para las columnas cromatográficas gel de sílice 60 (40-63  $\mu\text{m}$ , Merck). Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono fueron registrados utilizando un espectrómetro Bruker DRX-300. Los espectros de masas de alta resolución fueron registrados utilizando un espectrómetro TripleTOF™ 5600 (AB SCIEX). Los espectros de infrarrojo (FT-IR) se registraron en un espectrómetro Agilent Cary 630 FT-IR. Los espectros de absorción fueron realizados con un espectrofotómetro Shimadzu UV-2101PC y los espectros de fluorescencia se registraron mediante un fluorímetro Varían Cary Eclipse.

### Síntesis de 27

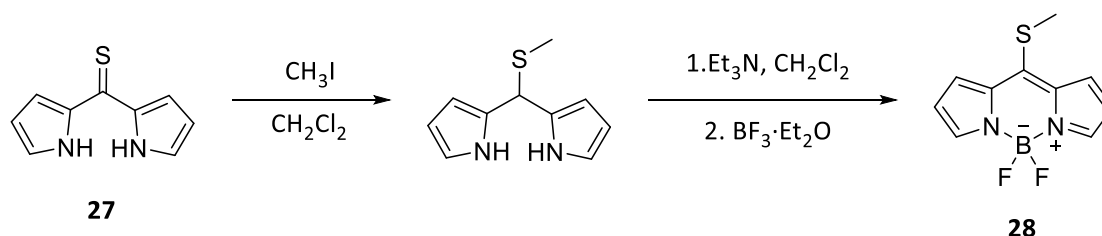


En un matraz de fondo redondo de 3 bocas se mezcló pirrol (3.00 mL, 43.3 mmol) disuelto en éter dietílico anhidro (20 mL) con tiofosgeno (1.87 mL, 24.4 mmol) disuelto en tolueno anhidro (20 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos bajo atmosfera de argón. Al finalizar este tiempo, se añadieron 10 mL de metanol y la disolución se mantuvo bajo agitación otros 30 minutos. Posteriormente, el disolvente se evaporó a presión reducida. El crudo de reacción

obtenido se purificó mediante columna cromatográfica de sílica gel (hexano/acetato de etilo, 8:2), obteniéndose **27** como un sólido marrón con un rendimiento del 19 % (810 mg).

$^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 6.42 (dt,  $J$ = 3.9, 2.5 Hz, 2H), 7.05 (ddd,  $J$ =3.8 Hz, 2.4, 1.3 Hz, 2H), 7.20 (td,  $J$ =2.8, 1.3 Hz, 2H), 9.77 (s, 2H).

### Síntesis de **28**

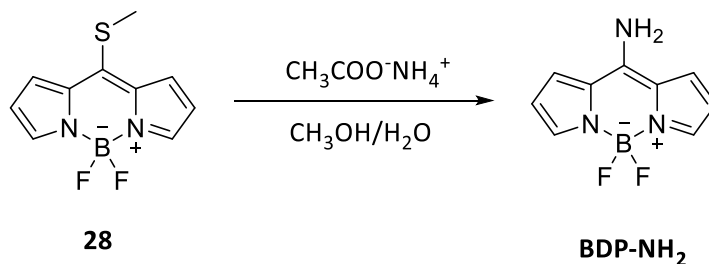


En un matraz de fondo redondo, se disolvió **27** (0.81 g, 4.6 mmol) en diclorometano seco (20 mL). A continuación, se añadió a la disolución yoduro de metilo (1.43 mL, 23.0 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos bajo atmosfera de argón. El disolvente se evaporó a presión reducida. El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano (20 mL), se añadió trietilamina (0.90 mL, 6.5 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos bajo atmosfera de argón. A continuación, se añadió  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (0.93 mL, 7.5 mmol) y se mantuvo la agitación 30 minutos más. Se evaporó el disolvente a presión reducida y el crudo se purificó mediante cromatografía en columna de sílica gel (hexano/acetato de etilo, 8:2), obteniendo **28** como un sólido marrón con un rendimiento del 47 % (510 mg).

$^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 2.92 (s, 3H), 6.54 (d,  $J$ = 4.2 Hz 2H), 7.43 (d,  $J$ = 4.2 Hz, 2H), 7.80 (s, 2H).



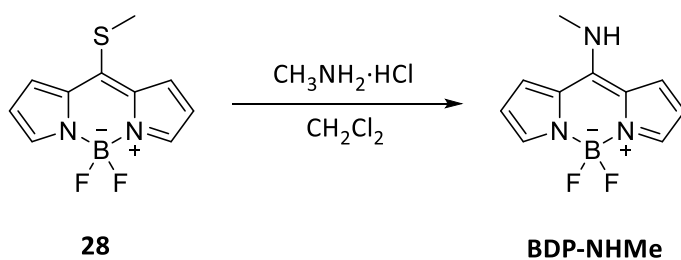
### Síntesis de BDP-NH<sub>2</sub>



En un matraz de fondo redondo, se disolvió **28** (100 mg, 0.4 mmol) en 5 mL de una mezcla metanol/agua (1:1) y se añadió acetato amónico (95 mg, 1.2 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas a 70 °C bajo atmosfera de argón. A continuación, el disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo, 5:5), obteniéndose **BDP-NH<sub>2</sub>** como un sólido amarillo con un rendimiento del 16 % (25 mg).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 6.45 (dd, J= 3.8, 2.2 Hz, 2H), 7.38 (d, J= 3.8 Hz, 2H), 7.46 (s, 2H).

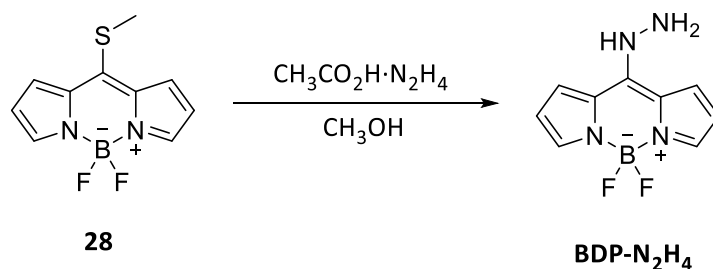
### Síntesis de BDP-NHMe



En un matraz de fondo redondo, se disolvió **28** (125 mg, 0.5 mmol) en 10 mL de diclorometano y se añadió hidrocloruro de metilamina (106 mg, 1.6 mmol). La mezcla se agitó durante 26 horas a temperatura ambiente bajo atmosfera de argón. A continuación, el disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo, 5:5), obteniéndose **BDP-NHMe** como un sólido amarillo con un rendimiento del 75 %.

$^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.30 (s, 3H), 6.31 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.63 (s, 1H).

#### Síntesis de BDP- $\text{N}_2\text{H}_4$

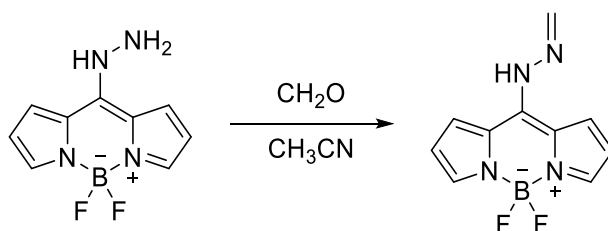


En un matraz de fondo redondo, se disolvió **28** (176 mg, 0.7 mmol) en metanol (20 mL) y se añadió acetato de hidrazina (204 mg, 2.2 mmol). La mezcla se agitó durante 5 horas a 70 °C bajo atmosfera de argón. A continuación, el disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (hexano/acetato de etilo, 5:5), obteniendo **BDP- $\text{N}_2\text{H}_4$**  como un sólido amarillo con un rendimiento del 16 % (25 mg).

$^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ):  $\delta$  (ppm) = 6.34 (m, 1H), 6.46 (m, 1H), 6.94 (d,  $J$  = 3.6 Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.82 (d,  $J$  = 3.6 Hz, 1H).

**HRMS** ( $\text{ESI}^+$ ):  $m/z$  calculado para  $\text{C}_9\text{H}_9\text{BF}_2\text{N}_4$ ; 222.09.  $[\text{M}+\text{H}]^+$  encontrada; 223.09.

#### Síntesis hidrazona entre BDP- $\text{N}_2\text{H}_4$ y formaldehído.



En un matraz de fondo redondo se disolvió **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** (25 mg, 0.11 mmol) en acetonitrilo (5 mL) y se añadió un gran exceso de formaldehído acuoso (36%, 100 µL, 1.31 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, el disolvente se evaporó a presión reducida obteniéndose como un sólido amarillento con un rendimiento del 95 % (24 mg) sin mayor purificación.

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ (ppm) = 6.46 (s, 2H), 6.92 (m, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.31 (m, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.96 (s, 1H).

#### Cálculo del rendimiento cuántico de **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>**

El cálculo del rendimiento cuántico se llevó a cabo empleando la siguiente fórmula:

$$\phi = \phi_R \left( \frac{m}{m_R} \right) \left( \frac{n^2}{n_R^2} \right)$$

Donde  $\phi_R$  es el rendimiento cuántico utilizado como referencia (sulfato de quinina),  $m$  y  $m_R$  son las pendientes de las gráficas de la intensidad máxima de fluorescencia frente al máximo de absorbancia de **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** y el sulfato de quinina respectivamente a tres concentraciones distintas y  $n$  y  $n_R$  son los índices de refracción de los disolventes empleados en cada caso.

Para ello, se prepararon disoluciones  $4.0 \cdot 10^{-5}$ ,  $4.5 \cdot 10^{-5}$  y  $5.0 \cdot 10^{-5}$  M de **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** y sulfato de quinina en acetonitrilo (índice de refracción de 1.344) y ácido sulfúrico 0.5 M (índice de refracción de 1.346) respectivamente. Se registraron los espectros de absorción y fluorescencia de todas las disoluciones y se representó el máximo de fluorescencia frente al máximo de absorción tanto para **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** como para el sulfato de quinina. Teniendo en cuenta el índice de refracción del sulfato de quinina (0.546), los valores de las pendientes obtenidas y los índices de refracción, se obtuvo un rendimiento cuántico para **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** de 0.16.

### Estudio de la velocidad de reacción entre BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> y formaldehído

A 100 µL de **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** (10<sup>-3</sup> M en acetonitrilo) se añadieron 100 µL de formalina (20 mM) y se registró el espectro de UV-visible y fluorescencia ( $\lambda_{exc}$  = 425 nm y  $\lambda_{em}$  = 455 nm) a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 10 minutos.

### Cálculo del límite de detección de BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> en disolución

100 µL de formaldehído acuoso (36 % o disoluciones diluidas) se añadieron a 100 µL de **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** (10<sup>-3</sup> M en acetonitrilo) alcanzando una concentración final de formaldehído entre 40 y 800 µM. Las disoluciones se agitaron durante 7 minutos y, a continuación, se tomaron 150 µL y se llevaron a 3 mL con acetonitrilo para registrar los espectros de UV-visible y fluorescencia. A continuación, se representó el máximo de emisión de fluorescencia frente a la concentración de formaldehído. El cálculo del límite de detección se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Límite de detección} = 3 \cdot \frac{S_b}{m} \quad (1)$$

Donde  $S_b$  es la desviación estándar del blanco (1.80) y  $m$  es la pendiente de la recta de calibrado (1.30).

### Estudio de interferentes

100 µL de cada interferente (metanol, acetona, butanal, benzaldehído o acetaldehído, 50 µM en acetonitrilo y glucosa y fenol 50 µM en agua) se añadieron a 100 µL de **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>**. Las disoluciones se agitaron durante 7 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se tomaron 150 µL y se llevaron a 3 mL con acetonitrilo para registrar los espectros de UV-visible y fluorescencia.

### Preparación de las tiras reactivas

Las tiras reactivas se prepararon sumergiendo cuadrados de papel de filtro de 1 cm de lado (celulosa, 0.17 mm de espesor y un gramaje de 73 g/m<sup>2</sup>) durante 1 segundo en una disolución de **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** (10<sup>-1</sup> M, acetonitrilo) y dejándolas secar al aire durante 30 minutos. Este proceso se repitió dos veces antes de utilizar las tiras reactivas.

### Determinación y cálculo del límite de detección en fase gas

Se suspendieron las tiras reactivas (con **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** previamente soportado) durante 20 minutos en el interior de un vial cerrado de 25 mL que contenía 5 mL de disolución acuosa de formaldehído de concentraciones conocidas a 25 °C.

$$P(atm) = \frac{Concentration(M)}{H_{eff}(M \cdot atm^{-1})} \quad (2)$$

$$ppm = P(atm) \cdot 10^6 \quad (3)$$

Utilizando la ley de Henry para estimar la concentración de formaldehído gas en equilibrio con formaldehído en disolución y una  $H_{eff}^{115} = 3700 \text{ M atm}^{-1}$ , se estableció una concentración de formaldehído vapor en el vial de 25 mL entre 1 y 80 ppm.

Tras realizar los experimentos, se fotografiaron las tiras reactivas y se analizaron los resultados mediante un programa de tratamiento de imagen (ImageJ). De este modo, se obtuvieron las coordenadas RGB de cada imagen como una media de 5 puntos. Para el cálculo del límite de detección, se determinó el porcentaje de variación del valor de la componente roja con respecto al blanco y se representó frente a la concentración de formaldehído. Empleando la fórmula anterior y una desviación del blanco obtenida de 1.9, se determinó el límite de detección correspondiente.



## **Capítulo 7. Conclusiones**





En la actualidad, el desarrollo de nuevos sistemas para la detección y monitorización de contaminantes o moléculas de interés es de vital importancia. Por tanto, el objetivo de la presente tesis era el diseño, la síntesis y posterior evaluación de distintos sistemas para la detección de formaldehído en disolución, extendiendo la detección a fase gas siempre y cuando fuese posible.

En el tercer capítulo, se ha descrito la preparación de un dosímetro capaz de reconocer formaldehído tanto en disolución acuosa como en aire. Los componentes del quimiadosímetro (dopamina, glicina y sacarosa) son baratos y respetuosos con el medio ambiente, si los comparamos con la mayoría de los reactivos usados en los sensores moleculares ópticos descritos en la introducción. En disolución pueden utilizarse tanto el cambio de color como la emisión de fluorescencia para la detección de formaldehído. La respuesta del dosímetro soportado sobre gel de sílice es colorimétrica e incluso puede seguirse a simple vista. Los límites de detección alcanzados para periodos de exposición largos y cortos a formaldehído gas han sido 0.4 y 0.7 ppm respectivamente, obtenidos mediante un sencillo programa de tratamiento de imagen. Finalmente, se realizaron pruebas de detección de formaldehído gas bajo condiciones reales, en la sala de disección de la Facultad de Medicina obteniéndose unos resultados aceptables.

En el cuarto capítulo se describe la síntesis de un dosímetro para formaldehído basado en un BODIPY como unidad señalizadora y un derivado de dopamina como unidad de reconocimiento. Se han caracterizado estructuralmente ambas unidades mediante resonancia magnética de protón y carbono, así como por espectrometría de masas. De igual modo, se han registrado los espectros de UV-visible y fluorescencia de ambas unidades. Se ha llevado a cabo el estudio del comportamiento frente a formaldehído de la unidad de reconocimiento y del sensor completo, observándose diferencias en las bandas de UV-visible y fluorescencia en presencia y ausencia de formaldehído.

En el quinto capítulo se relata cómo se ha sintetizado un dosímetro basado en nanopartículas de oro funcionalizadas con residuos de resorcinol para la detección colorimétrica de formaldehído tanto en disolución como en fase gas. El proceso de detección se basa en sucesivas reacciones de condensación y polimerización entre los residuos de resorcinol de la superficie de las distintas nanopartículas de oro y el formaldehído, desencadenando la agregación de las nanopartículas dispersas, produciendo un desplazamiento batocrómico de la banda de resonancia del plasmón superficial en el espectro de UV-visible con el correspondiente cambio de color asociado en la suspensión de rojo a azul, que se puede observar a simple vista. Se ha observado un aumento remarcable de la respuesta del dosímetro frente a formaldehído en presencia de tampón Tris-HCl. El dosímetro es capaz de detectar formaldehído en disolución con un LdD de 0.5 ppm, así como formaldehído gas emitido por distintos tipos de tablero, dando cualitativamente una señal mayor con los tableros de partículas de mayor contenido en formaldehído.

En el sexto y último capítulo, se han sintetizado los derivados nitrogenados de BODIPY **BDP-NH<sub>2</sub>**, **BDP-NHMe** y **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>**. De ellos, el compuesto **BDP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** ha demostrado ser un sensor efectivo para la detección de formaldehído tanto en disolución como en fase gas. El mecanismo de detección se basa en la formación de una hidrazona mediante la reacción entre un grupo hidrazina y formaldehído, produciendo un cambio en las propiedades ópticas de la molécula. Los límites de detección alcanzados mediante fluorescencia son 0.12 ppm para formaldehído en disolución y 1.1 ppm para formaldehído en fase gas.

## **Capítulo 8. Bibliografía**



- (1) Fischer, E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Ber. Dt. Chem. Ges.* **1894**, 27, 2985-2993.
- (2) Pedersen, C. J. Macrocyclic polyethers: Dibenzo-18-crown-6 polyether and dicyclohexyl-18-crown-6 polyether. *Org. Synth.* **1972**, 52, 66-74.
- (3) Atwood, J. L.; Davies, J. E. D.; MacNicol, D. D.; Vögtle F.; Lehn. J. M. Comprehensive supramolecular chemistry. *Angew. Chem.* **1997**, 109, 1055–1056.
- (4) KybaRoger, E. P.; Helgeson, C.; Madan, K.; Gokel, G. W.; Tarnowski, T. L.; Moore, S. S.; Cram, D. J. Host-guest complexation. Concept and illustration. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 2564-2571.
- (5) Lehn, J. M. Toward Complex Matter : Supramolecular Chemistry and Self-Organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 8, 4763-4768.
- (6) Down, J. L.; Lewis, J.; Moore, B.; Wilkinson, G. The solubility of alkali metals in ethers. *J. Chem. Soc.* **1959**, 0, 3767-3773.
- (7) Trültzsch, R.; Beger, J.; Buschmann H. J.; Schollmeyer, E. Influence of ligand structure and solvent effects on complexation of neutral guests by several crown ethers. *J. Solution Chem.* **1994**, 23, 53–61.
- (8) Lehn, J. M. Perspectives in supramolecular chemistry. From molecular recognition towards molecular information processing and self-organization. *Angen. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 1304-1319.
- (9) Hulanicki, A.; Glab. S.; Ingman, F. Chemical sensors. Definitions and classification. *Pure & Appl. Chem.* **1991**, 63, 1247–1250.
- (10) Gotor, R.; Costero, A. M.; Gaviña, P.; Gil, S.; Parra, M. Binding and fluorescent sensing of dicarboxylates by a Bis(Calix[4]pyrrole)-substituted BODIPY dye. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 8, 1515–1520.

- (11) Gaviña, P.; Almenar, E.; Costero, A. M.; Gil, S.; Parra, M. Towards the fluorogenic detection of peroxide explosives through host-guest chemistry. *R. Soc. open sci.* **2018**, *5*, 171787.
- (12) Kumar, V.; Rana, H.; Raviraju, G.; Gupta, A. K. Chemodosimeter for selective and sensitive chromogenic and fluorogenic detection of mustard gas for real time analysis. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 1417–1422.
- (13) Narayanaswamy, R. Optical chemical sensors: transduction and signal processing. *Analyst* **1993**, *4*, 317–322.
- (14) Suksai, C.; Tuntulani, T. Chromogenic anion sensors. *Top. Curr. Chem.* **2005**, *255*, 163–198.
- (15) Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F. New advances in fluorogenic anion chemosensors. *J. Fluoresc.* **2005**, *15*, 267–285.
- (16) Keefe, M. H.; Benkstein, K. D.; Hupp, J. T. Luminescent sensor molecules based on coordinated metals: a review of recent developments. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *205*, 201–228.
- (17) Vaughan, A. A.; Narayanaswamy, R. Optical fibre reflectance sensors for the detection of heavy metal ions based on immobilised Br-PADAP. *Sens. Actuator B Chem.* **1998**, *51*, 368–376.
- (18) Nikodem, M.; Wysocki, G. Molecular dispersion spectroscopy - new capabilities in laser chemical sensing. *Ann. NY. Acad. Sci.* **2012**, *1260*, 101–111.
- (19) Ye, F.; Chai, Q.; Liang, X. M.; Li, M. Q.; Wang, Z. Q.; Fu, Y. A highly selective and sensitive fluorescent turn-off probe for Cu<sup>2+</sup> based on a guanidine derivative. *Molecules.* **2017**, *22*, 1741-1755.
- (20) Gale, P. A.; Twyman, L. J.; Handlin, C. I.; Sessler, J. L. A colourimetric calix[4]pyrrole-4-nitrophenolate based anion sensor. *Chem. Commun.* **1999**, *2*, 1851–1852.

- (21) Hagimori, M.; Mizuyama, N.; Tominaga, Y.; Mukai, T.; Saji, H. A low-molecular-weight fluorescent sensor with  $\text{Zn}_2^+$  dependent bathochromic shift of emission wavelength and its imaging in living cells. *Dyes Pigment.* **2015**, *113*, 205–209.
- (22) Mohr, G. J. A chromoreactand for the selective detection of  $\text{HSO}_3^-$ -based on the reversible bisulfite addition reaction in polymer membranes. *Chem. Commun.* **2002**, *2*, 2646–2647.
- (23) Bhalla, V.; Roopa; Kumar, M.; Sharma, P. R.; Kaur, T. New fluorogenic sensors for  $\text{Hg}_2^+$  ions: through-bond energy transfer from pentaquinone to rhodamine. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 2150–2156.
- (24) Loudet, A.; Burgess, K. BODIPY dyes and their derivatives: syntheses and spectroscopic properties. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891–4932.
- (25) Treibs, A.; Kreuzer, F. H. Difluoroboryl-komplexe von di- und tripyrrylmethenen. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1968**, *718*, 208–223.
- (26) Moss, G. P. Nomenclature of tetrapyrroles. *Pure Appl. Chem.* **1987**, *59*, 779–832.
- (27) Wagner, R. W.; Lindsey, J. S. Boron-dipyrromethene dyes for incorporation in synthetic multi-pigment light-harvesting arrays. *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1373–1380.
- (28) Bañuelos-Prieto, J.; Agarrabeitia, A. R.; Garcia-Moreno, I.; Lopez-Arbeloa, I.; Costela, A.; Infantes, L.; Perez-Ojeda, M. E.; Palacios-Cuesta, M.; Ortiz, M. J. Controlling optical properties and function of BODIPY by using asymmetric substitution effects. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 14094–14105.
- (29) Li, Z.; Mintzer, E.; Bittman, R. First synthesis of free cholesterol-BODIPY conjugates. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1718–1721.
- (30) Tahtaoui, C.; Thomas, C.; Rohmer, F.; Klotz, P.; Duportail, G.; Mély, Y.; Bonnet, D.; Hibert, M. Convenient method to access new 4,4-dialkoxy- and 4,4-diaryloxy-diaza-s-indacene dyes: synthesis and spectroscopic evaluation. *J. Org. Chem.*

**2007**, 72, 269–272.

- (31) Goud, T. V.; Tutar, A.; Biellmann, J. F. Synthesis of 8-heteroatom-substituted 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene dyes (BODIPY). *Tetrahedron*. **2006**, 62, 5084–5091.
- (32) Bañuelos, J.; Martín, V.; Gómez-Durán, C. F. A.; Córdoba, I. J. A.; Peña-Cabrera, E.; García-Moreno, I.; Costela, Á.; Pérez-Ojeda, M. E.; Arbeloa, T.; Arbeloa, Í. L. New 8-amino-BODIPY derivatives: surpassing laser dyes at blue-edge wavelengths. *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 7261–7270.
- (33) Feng, Z.; Jiao, L.; Feng, Y.; Yu, C.; Chen, N.; Wei, Y.; Mu, X.; Hao, E. Regioselective and stepwise syntheses of functionalized BODIPY dyes through palladium-catalyzed cross-coupling reactions and direct C-H arylations. *J. Org. Chem.* **2016**, 81, 6281–6291.
- (34) Verbelen, B.; Leen, V.; Wang, L.; Boens, N.; Dehaen, W. Direct palladium-catalysed C-H arylation of BODIPY dyes at the 3- and 3,5-positions. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 9129-9131.
- (35) Leen, V.; Van Der Auweraer, M.; Boens, N.; Dehaen, W. Vicarious nucleophilic substitution of  $\alpha$ -hydrogen of BODIPY and its extension to direct ethenylation. *Org. Lett.* **2011**, 13, 1470–1473.
- (36) Zhou, X.; Yu, C.; Feng, Z.; Yu, Y.; Wang, J.; Hao, E.; Wei, Y.; Mu, X.; Jiao, L. Highly regioselective  $\alpha$ -chlorination of the BODIPY chromophore with copper(II) chloride. *Org. Lett.* **2015**, 17, 4632-4635.
- (37) Mirri, G.; Schoenmakers, D. C.; Kouwer, P. H. J.; Veranič, P.; Mušević, I.; Štefane, B. Synthesis of functional fluorescent BODIPY-based dyes through electrophilic aromatic substitution: straightforward approach towards customized fluorescent probes. *ChemistryOpen* **2016**, 5, 450–454.
- (38) Betancourt-Mendiola, L.; Valois-Escamilla, I.; Arbeloa, T.; Bañuelos, J.; López



- Arbeloa, I.; Flores-Rizo, J. O.; Hu, R.; Lager, E.; Gómez-Durán, C. F. A.; Belmonte-Vázquez, J. L. Scope and limitations of the Liebeskind-Srogl cross-coupling reactions involving the biellmann BODIPY. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 5771–5782.
- (39) Li, L.; Nguyen, B.; Burgess, K. Functionalization of the 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY) core. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3112–3116.
- (40) Zhu, S.; Zhang, J.; Vegesna, G.; Tiwari, A.; Luo, F. T.; Zeller, M.; Luck, R.; Li, H.; Green, S.; Liu, H. Controlled knoevenagel reactions of methyl groups of 1,3,5,7-tetramethyl BODIPY dyes for unique BODIPY dyes. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 404–407.
- (41) Zhang, D.; Martín, V.; García-Moreno, I.; Costela, A.; Pérez-Ojeda, M. E.; Xiao, Y. Development of xcellent long-wavelength BODIPY laser dyes with a strategy that combines extending  $\pi$ -conjugation and tuning ICT effect. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 13026–13033.
- (42) Karolin, J.; Johansson, L. B. A.; Strandberg, L.; Ny, T. Fluorescence and absorption spectroscopic properties of dipyrrometheneboron difluoride (BODIPY) derivatives in liquids, lipid membranes, and proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7801–7806.
- (43) Loudet, A.; Burgess, K. BODIPY dyes and their derivatives: syntheses and spectroscopic properties. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891–4932.
- (44) Lincoln, R.; Greene, L. E.; Bain, C.; Flores-Rizo, J. O.; Bohle, D. S.; Cosa, G. When push comes to shove: unravelling the mechanism and scope of nonemissive meso-unsaturated BODIPY dyes. *J. Phys. Chem. B.* **2015**, *119*, 4758–4765.
- (45) De Silva, A. P.; Moody, T. S.; Wright, G. D. Fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) sensors as potent analytical tools. *Analyst* **2009**, *134*, 2385–2393.
- (46) Daly, B.; Ling, J.; De Silva, A. P. Current developments in fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) sensors and switches. *Chem. Soc. Rev.* **2015**,

44, 4203–4211.

- (47) Dale, T. J.; Rebek, J. Fluorescent sensors for organophosphorus nerve agent mimics. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4500–4501.
- (48) Vollmer, F.; Rettig, W.; Birckner, E. Photochemical mechanisms producing large fluorescence Stokes shifts. *J. Fluoresc.* **1994**, *4*, 65–69.
- (49) Yang, R.; Li, K.; Wang, K.; Zhao, F.; Li, N.; Liu, F. Porphyrin assembly on  $\beta$ -cyclodextrin for selective sensing and detection of a zinc ion based on the dual emission fluorescence ratio. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 612–621.
- (50) Okorochenkova, Y.; Porubský, M.; Benická, S.; Hlaváč, J. A novel three-fluorophore system as a ratiometric sensor for multiple protease detection. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 7589–7592.
- (51) Fan, J.; Hu, M.; Zhan, P.; Peng, X. Energy transfer cassettes based on organic fluorophores: construction and applications in ratiometric sensing. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 29–43.
- (52) Kikuchi, K.; Takakusa, H.; Nagano, T. Recent advances in the design of small molecule-based FRET sensors for cell biology. *Trac-Trends Anal. Chem.* **2004**, *23*, 407–415.
- (53) Shao, J.; Sun, H.; Guo, H.; Ji, S.; Zhao, J.; Wu, W.; Yuan, X.; Zhang, C.; James, T. D. A highly selective red-emitting FRET fluorescent molecular probe derived from BODIPY for the detection of cysteine and homocysteine: an experimental and theoretical study. *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 1049–1061.
- (54) Woźniak, A. K.; Schröder, G. F.; Grubmüller, H.; Seidela, C. A. M.; Oesterhelt, F. Single-molecule FRET measures bends and kinks in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 18337–18342.
- (55) Ray, P. C.; Fortner, A.; Darbha, G. K. Gold nanoparticle based FRET assay for the detection of DNA cleavage. *J. Phys. Chem. B.* **2006**, *110*, 20745–20748.

- (56) Preus, S.; Wilhelmsson, L. M. Advances in quantitative FRET-based methods for studying nucleic acids. *ChemBioChem.* **2012**, *13*, 1990–2001.
- (57) Schuler, B.; Eaton, W. A. Protein folding studied by single-molecule FRET. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *18*, 16–26.
- (58) Oh, E.; Hong, M. Y.; Lee, D.; Nam, S. H.; Yoon, H. C.; Kim, H. S. Inhibition assay of biomolecules based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) between quantum dots and gold nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3270–3271.
- (59) Gong, Y. J.; Zhang, X. B.; Zhang, C. C.; Luo, A. L.; Fu, T.; Tan, W.; Shen, G. L.; Yu, R. Q. Through bond energy transfer: a convenient and universal strategy toward efficient ratiometric fluorescent probe for bioimaging applications. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 10777–10784.
- (60) Judeinstein, P.; Sanchez, C. Hybrid organic-inorganic materials: a land of multidisciplinary. *J. Mater. Chem.* **1996**, *6*, 511–525.
- (61) Parola, S.; Julián-López, B.; Carlos, L. D.; Sanchez, C. Optical properties of hybrid organic-inorganic materials and their applications. *Adv. Funct. Mater.* **2016**, *26*, 6506–6544.
- (62) Zhao, G. X. S. Novel porous materials for emerging applications. *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 623–625.
- (63) Webb, J. D.; MacQuarrie, S.; McEleney, K.; Crudden, C. M. Mesoporous silica-supported Pd catalysts: An investigation into structure, activity, leaching and heterogeneity. *J. Catal.* **2007**, *252*, 97–109.
- (64) Boissière, C.; Martinez, M. U.; Larbot, A.; Prouzet, E. On the specific filtration mechanism of a mesoporous silica membrane, prepared with non-connecting parallel pores. *J. Membr. Sci.* **2005**, *251*, 17–28.
- (65) Manzano, M.; Aina, V.; Areán, C. O.; Balas, F.; Cauda, V.; Colilla, M.; Delgado, M. R.; Vallet-Regí, M. Studies on MCM-41 mesoporous silica for drug delivery:

- Effect of particle morphology and amine functionalization. *Chem. Eng. J.* **2008**, *137*, 30-37.
- (66) Slowing, I. I.; Trewyn, B. G.; Giri, S.; Lin, V. S.-Y. Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery and biosensing applications. *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 1225-1236.
- (67) Faulk, W. P.; Taylor, G. M. An immunocolloid method for the electron microscope. *Mol. Immunol.* **1971**, *8*, 1081-1083.
- (68) Sardar, R.; Funston, A. M.; Mulvaney, P.; Murray, R. W. Gold nanoparticles: past, present, and future. *Langmuir.* **2009**, *25*, 13840-13851.
- (69) Link, S.; El-Sayed, M. A. Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles. *J. Phys. Chem. B.* **1999**, *103*, 4212-4217.
- (70) Willets, K. A.; Van-Duyne, R. P. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, *58*, 267-297.
- (71) Priyadarshini, E.; Pradhan, N. Gold nanoparticles as efficient sensors in colorimetric detection of toxic metal ions: a review. *Sens. Actuator B Chem.* **2017**, *238*, 888-902.
- (72) Han, C.; Zeng, L.; Li, H.; Xie, G. Colorimetric detection of pollutant aromatic amines isomers with p-sulfonatocalix[6]arene-modified gold nanoparticles. *Sens. Actuator B Chem.* **2009**, *137*, 704-709.
- (73) Zhang, F.; Lees, E.; Amin, F.; Rivera-Gil, P.; Yang, F.; Mulvaney, P.; Parak, W. J. Polymer-coated nanoparticles: a universal tool for biolabelling experiments. *Small.* **2011**, *7*, 3113-3127.
- (74) Thambiraj, S.; Hema, S.; Shankaran, D. R. Functionalized gold nanoparticles for drug delivery applications. *Mater. Today* **2018**, *5*, 16763-16773.

- (75) Corma, A.; Garcia, H. Supported gold nanoparticles as catalysts for organic reactions. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 2096–2126.
- (76) Balasubramanian, S. K.; Yang, L.; Yung, L. Y. L.; Ong, C. N.; Ong, W. Y.; Yu, L. E. Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles. *Biomaterials*. **2010**, *31*, 9023–9030.
- (77) Woehrle, G. H.; Brown, L. O.; Hutchison, J. E. Thiol-functionalized, 1.5-nm gold nanoparticles through ligand exchange reactions: scope and mechanism of ligand exchange. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2172–2183.
- (78) Eustis, S.; El-Sayed, M. A. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 209–217.
- (79) Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55–75.
- (80) Kumar, S.; Gandhi, K. S.; Kumar, R. Modeling of formation of gold nanoparticles by citrate method. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2007**, *46*, 3128–3136.
- (81) Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, *7*, 801–802.
- (82) Su, K. H.; Wei, Q. H.; Zhang, X.; Mock, J. J.; Smith, D. R.; Schultz, S. Interparticle coupling effects on plasmon resonances of nanogold particles. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1087–1090.
- (83) Obare, S. O.; Hollowell, R. E.; Murphy, C. J. Sensing strategy for lithium ion based on gold nanoparticles. *Langmuir*. **2002**, *18*, 10407–10410.
- (84) Martí, A.; Costero, A. M.; Gaviña, P.; Gil, S.; Parra, M.; Brotons-Gisbert, M.;

- Sánchez-Royo, J. F. Functionalized gold nanoparticles as an approach to the direct colorimetric detection of DCNP nerve agent simulant. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 22, 4770–4779.
- (85) Bruemmer, K. J.; Brewer, T. F.; Chang, C. J. Fluorescent probes for imaging formaldehyde in biological systems. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, 39, 17–23.
- (86) US Dept. of Health and Human Services. Occupational safety and health guideline for formaldehyde potential human carcinogen. **1988**.
- (87) Formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-tert-butoxypropan-2-ol. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks. Hum.* **2006**, 88, 401-432.
- (88) U.S. Department of Health and Human Services. Formaldehyde. *14<sup>th</sup> report on carcinogens*. **2016**.
- (89) Chung, P. R.; Tzeng, C. T.; Ke, M. T.; Lee, C. Y. Formaldehyde gas sensors: a review. *Sensors* **2013**, 13, 4468–4484.
- (90) Luo, W.; Li, H.; Zhang, Y.; Ang, C. Y. W. Determination of formaldehyde in blood plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B.* **2001**, 753, 253–257.
- (91) Klein-douwel, R. J. H.; Luque, J.; Jeffries, J. B.; Smith, G. P.; Crosley, D. R. Laser-induced fluorescence of formaldehyde hot bands in flames. *Appl. Opt.* **2000**, 39, 3712-3715.
- (92) Rocha, R.; Coelho, H. G.; Lopes, M. L. A.; Carvalho, L. R. F.; Gutz, I. G. R. Environmental formaldehyde analysis by active diffusive sampling with a bundle of polypropylene porous capillaries followed by capillary zone electrophoretic separation and contactless conductivity detection. *Talanta*. **2008**, 76, 271–275.
- (93) Demkiv, O.; Smutok, O.; Paryzhak, S.; Gayda, G.; Sultanov, Y. Reagentless amperometric formaldehyde-selective biosensors based on the recombinant yeast formaldehyde dehydrogenase. *Talanta*. **2008**, 76, 837–846.

- (94) Antwi-boampong, S.; Peng, J. S.; Carlan, J.; Belbruno, J. J. A molecularly imprinted fluoral-P/polyaniline double layer sensor system for selective sensing of formaldehyde. *IEEE Sensors Journal*. **2014**, *14*, 1490–1498.
- (95) Risholm-Sundman, M.; Larsen, A.; Vestin, E.; Weibull, A. Formaldehyde emission-comparison of different standard methods. *Atmos. Environ.* **2007**, *41*, 3193–3202.
- (96) Zhou, X.; Lee, S.; Xu, Z.; Yoon, J. Recent progress on the development of chemosensors for gases. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 7944-8000.
- (97) Brewer, T. F.; Chang, C. J. An aza-cope reactivity-based fluorescent probe for imaging formaldehyde in living cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 10886-10889.
- (98) Li, J.; Wang, Q.; Yuan, L.; Wu, Y.; Hu, X.; Zhang, X.; Tan, W. A two-photon fluorescent probe for bio-imaging of formaldehyde in living cells and tissues. *Analyst*. **2016**, *141*, 3395–3402.
- (99) Singha, S.; Jun, Y. W.; Bae, J.; Ahn, K. H. Ratiometric imaging of tissue by two-photon microscopy : observation of a high level of formaldehyde around mouse intestinal crypts. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 3724-3731.
- (100) Fauzia, V.; Imawan, C.; Made, N.; Savitri, M.; Putri, A. E. A localized surface plasmon resonance enhanced dye-based biosensor for formaldehyde detection. *Sens. Actuator B Chem.* **2018**, *257*, 1128–1133.
- (101) Song, H.; Rajendiran, S.; Kim, N.; Kwan, S.; Koo, E.; Park, G.; Daniel, T.; Yoon, S. A tailor designed fluorescent "turn-on" sensor of formaldehyde based on the BODIPY motif. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 4913–4916.
- (102) Zhou, Y.; Yan, J.; Zhang, N.; Li, D.; Xiao, S.; Zheng, K. A ratiometric fluorescent probe for formaldehyde in aqueous solution, serum and air using aza-cope reaction. *Sens. Actuators B Chem.* **2018**, *258*, 156-162.
- (103) Li, Z.; Xue, Z.; Wu, X.; Han, J.; Han, S. Chromo-fluorogenic detection of aldehydes

- with a rhodamine based sensor featuring an intramolecular deoxylactam. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7652-7654.
- (104) Chaiendoo, K.; Sooksin, S.; Kulchat, S.; Promarak, V.; Tuntulani, T.; Ngeontae, W. A new formaldehyde sensor from silver nanoclusters modified Tollens' reagent. *Food Chemistry*. **2018**, *255*, 41-48.
- (105) El Sayed, S.; Pascual, Ll.; Licchelli, M.; Martínez-Máñez, R.; Gil, S.; Costero, A. M.; Sancenón, F. Chromogenic detection of aqueous formaldehyde using functionalized silica nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. **2016**, *8*, 14318–14322.
- (106) Guo, X. L.; Chen, Y.; Jiang, H. L.; Qiu, X. B.; Yu, D. L. Smartphone-based microfluidic colorimetric sensor for gaseous formaldehyde determination with high sensitivity and selectivity. *Sensors*. **2018**, *18*, 3141-3152.
- (107) Guglielmino, M.; Allouch, A.; Serra, C. A.; Le Calvé, S. Development of microfluidic analytical method for on-line gaseous Formaldehyde detection, *Sens. Actuators B: Chem.* **2017**, *243*, 963-970.
- (108) Xia, H.; Hu, J.; Tang, J.; Xu, K.; Hou, X.; Wu, P. A RGB-type quantum dot-based sensor array for sensitive visual detection of trace formaldehyde in air. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 36794.
- (109) He, L.; Yang, X.; Ren, M.; Kong, X.; Liu, Y.; Lin, W. An ultra-fast illuminating fluorescent probe for monitoring formaldehyde in living cells, shiitake mushrooms, and indoors. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 9582-9585.
- (110) Liu, J.; Zhang, Y.; Yao, H.; Wei, T. Ultrasensitive detection of formaldehyde in gas and solutions by a catalyst preplaced sensor based on a pillar[5]arene derivative. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2018**, *6*, 8775-8781.
- (111) Pictet, A.; Spengler, T. Über die bildung von isochinolin-derivaten durch einwirkung von methylal auf phenyl-äthylamin, phenyl-alanin und tyrosin. *Ber.*



*Dtsch. Chem. Ges.* **1911**, *44*, 2030-2036.

- (112) Stöckigt, J.; Antonchick, A. P.; Wu, F.; Waldmann, H. The pictet-spengler reaction in nature and in organic chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8538–8564.
- (113) Jonsson, G. Fluorescence studies on some 6,7-substituted 3,4-dihydroisoquinolines formed from 3-hydroxytyramine (dopamine) and formaldehyde. *Acta Chem. Scand.* **1966**, *20*, 2755-2762.
- (114) Björklund, A.; Ehinger B.; Falck B. A method for differentiating dopamine from noradrenaline in tissue sections by microspectrofluorometry. *J. Histochem. Cytochem.* **1968**, *16*, 263-270.
- (115) Liu, X.; Guo, Z.; Roache, N. F.; Mocka, C. A.; Allen, M. R.; Mason, M. A. Henry's law constant and overall mass transfer coefficient for formaldehyde emission from small water pools under simulated indoor environmental conditions. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, 1603–1610.
- (116) Han, J.; Loudet, A.; Barhoumi, R.; Burghardt, R. C.; Burgess, K. A ratiometric pH reporter for imaging protein-dye conjugates in living cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1642–1643.
- (117) Wan, C. W.; Burghart, A.; Chen, J.; Bergström, F.; Johansson, L. B. .; Wolford, M. F.; Kim, T. G.; Topp, M. R.; Hochstrasser, R. M.; Burgess, K. Anthracene-BODIPY cassettes: syntheses and energy transfer. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4430–4441.
- (118) Yu, M.; Wong, J. K. H.; Tang, C.; Turner, P.; Todd, M. H.; Rutledge, P. J. Efficient deprotection of F-BODIPY derivatives: removal of BF<sub>2</sub> using Brønsted acids. *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 37–41.
- (119) Barba-Bon, A.; Calabuig, L.; Costero, A. M.; Gil, S.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F. Off-on BODIPY-based chemosensors for selective detection of Al<sup>3+</sup> and Cr<sup>3+</sup> versus Fe<sup>3+</sup> in aqueous media. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 8962–8965.
- (120) Luo, Y.; Yuan, C.; Xu, J.; Li, Y.; Liu, H.; Semin, S.; Rasing, T.; Yang, W.; Li, Y.

- Controlling the growth of molecular crystal aggregates with distinct linear and nonlinear optical properties. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 30862–30871.
- (121) Das, B.; Venkateswarlu, K.; Majhi, A.; Siddaiah, V.; Reddy, K. R. A facile nuclear bromination of phenols and anilines using NBS in the presence of ammonium acetate as a catalyst. *J. Mol. Catal. A Chem.* **2007**, *267*, 30–33.
- (122) McNulty, J.; Steere, J. A.; Wolf, S. The ultrasound promoted knoevenagel condensation of aromatic aldehydes. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8013–8016.
- (123) Nose, A.; Kudo, T. Studies of reduction with the sodium borohydride-transition metal boride system. I. Reduction of nitro and the other functional groups with the sodium borohydride-nickel boride system. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 1529-1533.
- (124) Sinhababu, A. K.; Borchardt, R. T. Silica gel-assisted reduction of nitrostyrenes to 2-aryl-1-nitroalkanes with sodium borohydride. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 227-230.
- (125) Sindhu, K. S.; Anilkumar, G. Recent advances and applications of glaser coupling employing greener protocols. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 27867–27887.
- (126) Bosiak, M. J. A Convenient synthesis of 2-arylbenzo[b]furans from aryl halides and 2-halophenols by catalytic one-pot cascade method. *ACS Catal.* **2016**, *6*, 2429–2434.
- (127) Rong, Z.; Gao, K.; Zhou, L.; Lin, J.; Qian, G. Facile synthesis of 2-substituted benzo[b]furans and indoles by copper-catalyzed intramolecular cyclization of 2-alkynyl phenols and tosylanilines. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 17975–17978.
- (128) Chinchilla, R.; Nájera, C. The sonogashira reaction: a booming methodology in synthetic organic chemistry. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 874–922.
- (129) Ayabe, M.; Yamashita, K.; Sada, K.; Shinkai, S.; Ikeda, A.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K. Construction of monomeric and polymeric porphyrin

- compartments by a Pd(II)-pyridine interaction and their chiral twisting by a BINAP ligand. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 1059–1066.
- (130) Maresh, J. J.; Ralko, A. A.; Speltz, T. E.; Burke, J. L.; Murphy, C. M.; Gaskell, Z.; Girel, J. K.; Terranova, E.; Richtscheidt, C.; Krzeszowiec, M. Chemoselective Zinc/HCl reduction of halogenated  $\beta$ -nitrostyrenes: synthesis of halogenated dopamine analogues. *Synlett.* **2014**, *25*, 2891–2894.
- (131) Saha, K.; Agasti, S. S.; Kim, C.; Li, X.; Rotello, V. M. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2739–2779.
- (132) Fauzia, V.; Nurlily; Imawan, C.; Narayani, N. M. M. S.; Putri, A. E. A localized surface plasmon resonance enhanced dye-based biosensor for formaldehyde detection. *Sens. Actuator B Chem.* **2018**, *257*, 1128–1133.
- (133) Kong, B.; Zhu, A.; Luo, Y.; Tian, Y.; Yu, Y.; Shi, G. Sensitive and selective colorimetric visualization of cerebral dopamine based on double molecular recognition. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2011**, *50*, 1837–1840.
- (134) Ma, P.; Liang, F.; Wang, D.; Yang, Q.; Ding, Y.; Yu, Y.; Gao, D.; Song, D.; Wang, X. Ultrasensitive determination of formaldehyde in environmental waters and food samples after derivatization and using silver nanoparticle assisted SERS. *Microchim. Acta.* **2014**, *182*, 863–869.
- (135) Wen, G.; Liang, X.; Liang, A.; Jiang, Z. Gold nanorod resonance Rayleigh scattering-energy transfer spectral determination of trace formaldehyde with 4-amino-3-hydrazino-5-mercap-1,2,4-triazole. *Plasmonics.* **2015**, *10*, 1081–1088.
- (136) Lu, K.; Ye, W.; Zhou, L.; Collins, L. B.; Chen, X.; Gold, A.; Ball, L. M.; Swenberg, J. A. Structural characterization of formaldehyde-induced cross-links between amino acids and deoxynucleosides and their oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3388–3399.
- (137) Martí, A.; Costero, A. M.; Gaviña, P.; Parra, M. Selective colorimetric NO(g)

- detection based on the use of modified gold nanoparticles using click chemistry. *Chem. Commun.* **2015**, 51, 3077–3079.
- (138) Godoy-Reyes, T. M.; Llopis-Lorente, A.; Costero, A. M.; Sancenón, F.; Gaviña, P.; Martínez-Máñez, R. Selective and sensitive colorimetric detection of the neurotransmitter serotonin based on the aggregation of bifunctionalised gold nanoparticles. *Sens. Actuator B Chem.* **2018**, 258, 829–835.
- (139) Arend, M.; Westermann, B.; Risch, N. Modern variants of the Mannich reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1044–1070.
- (140) Joshi, N. S.; Whitaker, L. R.; Francis, M. B. A Three-component mannich-type reaction for selective tyrosine bioconjugation. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15942–15943.
- (141) Omura, Y.; Taruno, Y.; Irida, Y.; Morimoto, M.; Saimoto, H.; Shigemasa, Y. Regioselective Mannich reaction of phenolic compounds and its application to the synthesis of new chitosan derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 7273–7275.
- (142) Cardellicchio, C.; Capozzi, M. A. M.; Naso, F. The Betti base: the awakening of a sleeping beauty. *Tetrahedron Asymmetry.* **2010**, 21, 507–517.
- (143) Dai, H. G.; Li, J. T.; Li, T. S. Efficient and practical synthesis of Mannich bases related to gramine mediated by zinc chloride. *Synth. Commun.* **2006**, 36, 1829–1835.
- (144) Candeias, N. R.; Montalbano, F.; Cal, P. M. S. D.; Gois, P. M. P. Boronic acids and esters in the petasis-borono Mannich multicomponent reaction. *Chem. Rev.* **2010**, 110, 6169–6193.
- (145) Brydson, J. A. Phenolic resins. *Plastic materials*, fifth edition; London, **1989**, 594–625.
- (146) Al-Muhtaseb, S. A.; Ritter, J. A. Preparation and properties of resorcinol-

- formaldehyde organic and carbon gels. *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 101–114.
- (147) Pekala, R. W. Low density, resorcinol-formaldehyde aerogels. U.S. Patent 4,873,218, Oct. 10, 1989.
- (148) Emelichev, V. A.; Ovchinnikov, V. G. Optimization theory on antichains with the Steinitz exchange property. *Cybern. Syst.* **1985**, *21*, 216–221.
- (149) Lewicki, J. P.; Fox, C. A.; Worsley, M. A. On the synthesis and structure of resorcinol-formaldehyde polymeric networks-precursors to 3D-carbon macroassemblies. *Polymer*. **2015**, *69*, 45–51.
- (150) Liu, X.; Atwater, M.; Wang, J.; Huo, Q. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloid Surf. B Biointerfaces*. **2007**, *58*, 3–7.
- (151) Pakiari, A. H.; Jamshidi, Z. Nature and strength of M-S bonds (M= Au, Ag, and Cu) in binary alloy gold clusters. *J. Phys. Chem. A*. **2010**, *114*, 9212–9221.
- (152) Xue, Y.; Li, X.; Li, H.; Zhang, W. Quantifying thiol-gold interactions towards the efficient strength control. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 1–9.
- (153) Oh, E.; Susumu, K.; Mäkinen, A. J.; Deschamps, J. R.; Huston, A. L.; Medintz, I. L. Colloidal stability of gold nanoparticles coated with multithiol-poly(ethylene glycol) ligands: importance of structural constraints of the sulfur anchoring groups. *J. Phys. Chem. C*. **2013**, *117*, 18947–18956.
- (154) Appendino, G.; Minassi, A.; Daddario, N.; Bianchi, F.; Tron, G. C. Chemoselective esterification of phenolic acids and alcohols. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3839–3841.
- (155) Li, T.; Cao, M.; Liang, J.; Xie, X.; Du, G. Mechanism of base-catalyzed resorcinol-formaldehyde and phenol-resorcinol-formaldehyde condensation reactions: a theoretical study. *Polymers*. **2017**, *9*, 426–440.
- (156) Donnally, L. H. Quantitative determination of formaldehyde and benzaldehyde

- and their bisulfite addition products. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **1933**, *5*, 91–92.
- (157) Jackson, A. W.; Fulton, D. A. The formation of core cross-linked star polymers containing cores cross-linked by dynamic covalent imine bonds. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6051–6053.
- (158) Meyer, C. D.; Joiner, C. S.; Stoddart, J. F. Template-directed synthesis employing reversible imine bond formation. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1705–1723.
- (159) Jin, Y.; Yu, C.; Denman, R. J.; Zhang, W. Recent advances in dynamic covalent chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6634–6654.
- (160) Luo, W.; Zhu, Y.; Zhang, J.; He, J.; Chi, Z.; Miller, P. W.; Chen, L.; Su, C. Y. A dynamic covalent imine gel as a luminescent sensor. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 11942–11945.
- (161) Song, H.; Rajendiran, S.; Kim, N.; Jeong, S. K.; Koo, E.; Park, G.; Thangadurai, T. D.; Yoon, S. A tailor designed fluorescent “turn-on” sensor of formaldehyde based on the BODIPY motif. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 4913–4916.
- (162) Hassan, M.; Tehrani, H.; Zarghi, A.; Fathali, S. A modified method for the synthesis of nitrofurazone. *Iran. J. Pharm. Res.* **2003**, *2*, 67–69.
- (163) Fieber, W.; Lehn, J.; Herrmann, A.; Gene, C.-. Controlled release of volatile aldehydes and ketones from dynamic mixtures generated by reversible hydrazone formation. *Helv. Chim. Acta.* **2007**, *90*, 2281–2314.
- (164) Lazny, R.; Nodzevska, A.; Sienkiewicz, M.; Wolosewicz, K. Strategy for the synthesis of polymeric supports with hydrazone linkers for solid-phase alkylation of ketones and aldehydes. *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 109–116.
- (165) Reeves, A. G.; Subbarao, M.; Lippert, A. R. Imaging acetaldehyde formation during ethanol metabolism in living cells using a hydrazinyl naphthalimide fluorescent probe. *Anal. Methods* **2017**, *9*, 3418–3421.

- (166) Tang, Y.; Kong, X.; Xu, A.; Dong, B.; Lin, W. Development of a two-photon fluorescent probe for imaging of endogenous formaldehyde in living tissues. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 3356–3359.
- (167) Lu, H.; MacK, J.; Yang, Y.; Shen, Z. Structural modification strategies for the rational design of red/NIR region BODIPY. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 4778–4823.
- (168) Peña-Cabrera, E.; Aguilar-Aguilar, A.; González-Domínguez, M.; Lager, E.; Zamudio-Vázquez, R.; Godoy-Vargas, J.; Villanueva-García, F. Simple, general, and efficient synthesis of meso-substituted borondipyrromethenes from a single platform. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3985–3988.
- (169) Guerrero-Corella, A.; Asenjo-Pascual, J.; Pawar, T. J.; Díaz-Tendero, S.; Martín-Sómer, A.; Gómez, C. V.; Belmonte-Vázquez, J. L.; Ramírez-Ornelas, D. E.; Peña-Cabrera, E.; Fraile, A. BODIPY as electron withdrawing group for the activation of double bonds in asymmetric cycloaddition reactions. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 4346–4351.
- (170) Feng, H.; Jia, H.; Sun, Z. Mild and catalyst-free petasis/decarboxylative domino reaction: chemoselective synthesis of N-Benzyl propargylamines. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 11812–11818.
- (171) Roacho, R. I.; Metta-Magaña, A.; Portillo, M. M.; Peña-Cabrera, E.; Pannell, K. H. 8-amino-BODIPY: structural variation, solvent-dependent emission, and VT NMR spectroscopic properties of 8-R<sub>2</sub>N-BODIPY. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 4245–4250.
- (172) Rezende, L. C. D.; Vaidergorn, M. M.; Moraes, J. C. B.; Emery, F. S. Synthesis, photophysical properties and solvatochromism of meso-substituted tetramethyl BODIPY dyes. *J. Fluoresc.* **2014**, *24*, 257–266.